



Departamento de Regeneración y Terapia Celular



*Departamento de
Biología Molecular e
Ingeniería Bioquímica*

Papel de los factores de transcripción GATA en la función de las células β pancreáticas y en el mantenimiento de la identidad del epitelio gástrico

Laura Villamayor Coronado

Tesis doctoral

Sevilla, 2019

Memoria presentada por Laura Villamayor Coronado para optar al grado de Doctora por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) de Sevilla, bajo la supervisión de la doctora Anabel Rojas González.



D.^a ANABEL ROJAS GONZÁLEZ, DOCTORA EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y PROFESORA DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE DE SEVILLA

CERTIFICA

que el trabajo de investigación que lleva por título “Papel de los factores de transcripción GATA en la función de las células β pancreáticas y en el mantenimiento de la identidad del epitelio gástrico” ha sido realizado por la licenciada D. ^a Laura Villamayor Coronado bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al grado de Doctora por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

En Sevilla, a 30 de septiembre de 2019

La Directora de la Tesis,

Dra. Anabel Rojas González

La Doctoranda,

Laura Villamayor Coronado

La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real,

Max Planck

AGRADECIMIENTOS

Como en cualquier etapa de la vida, nos rodean y acompañan personas que nos hacen el camino más fácil y ameno. Por ello, tras finalizar mi etapa doctoral no puedo olvidar agradecerles sinceramente y dedicar unas palabras a cada uno de ellos.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi directora Anabel que me diera la oportunidad de poder iniciar una carrera investigadora y que depositara toda su confianza en mí para realizar este trabajo. He tenido la suerte de encontrar la mejor mentora y referente que pudiera imaginar en esta profesión tan compleja. Tengo que agradecerle la paciencia que ha tenido conmigo formándome mano a mano desde el principio, por estar siempre pendiente de mí y de mi trabajo. Me has enseñado a ser rigurosa, a encontrar siempre otro punto de vista, a saber arriesgar y sobre todo a no rendirme; espero haber estado a la altura.

En CABIMER tenemos la suerte de tener grandes profesionales a nuestro servicio para ayudarnos en cualquier ocasión. Quiero agradecer a los técnicos de CIBERDEM, a Paloma, a Merche, a Cindy, a Nacho, a Elo y Mónica, a las niñas del animalario y al personal de cocina el estar siempre ahí cuando he tenido una duda o he necesitado ayuda.

He tenido la gran suerte de cruzarme por el laboratorio con grandes compañeros a lo largo de mi andadura. La primera persona que me enseñó a desenvolverme por el laboratorio fue Manu. Le quiero agradecer todos los trucos y consejos que solo se aprenden después de años de experiencia. Fuiste un gran docente y mejor compañero. A los estudiantes que han pasado por CT2 les tengo que agradecer mucho, y su estupendo trabajo se ve reflejado en esta tesis doctoral. De todos y cada uno de ellos he aprendido algo: de Mari Carmen y Cristina aprendí que la juventud no está reñida con la responsabilidad y el trabajo bien hecho; de Julia a tener siempre una sonrisa incluso en los peores momentos; de Marta a ser positiva en la vida y a creer en la bondad de las personas y de Ángel a no perder la inocencia y las ganas de seguir aprendiendo. Estoy muy orgullosa del trabajo que realizasteis cada uno de vosotros y estoy convencida de que la vida os brindará grandes oportunidades. Os llevo en mi corazoncito.

Dos de mis compañeros se merecen una mención especial. A Alberto tengo que agradecerle la paciencia que tuvo durante todo el verano del 2018, aunque resoplaras, te quejaras y te doliera el dedo gordo del pie sé que echas mucho de menos nuestros ratoncitos. Tu ayuda y compañía fue esencial en ese momento de desesperación y trabajo desbordante. También por dejarnos chincharte y echarnos unas risas. Noelia eres la persona con la que más he disfrutado trabajando, siempre dispuesta a todo y con infinitas ganas de aprender. Además, has sido una compañera maravillosa, preocupada de que todo saliera bien y pudiéramos disfrutar de un día de risas y trabajo en el laboratorio. Has sido un gran apoyo en mi último año, ayudándome y animándome incluso en la distancia. Por suerte aún nos queda tiempo de trabajo juntas. Sé que vas a hacer un gran doctorado, y estaré a tu lado para ayudarte en todo lo que esté en mi mano. No me puedo olvidar de Elisa, risueña y feliz de la vida como ella sola; gracias por tu disposición y ayuda.

Al otro sector de CT2, que hemos compartido espacio y vivencias, también tengo mucho que agradecer. A Franz quiero agradecerle su calidez e interés por mi trabajo durante todo el doctorado. Lourdes, has sido un gran apoyo y siempre me has dado grandes consejos, eres un cielo de niña y te mereces lo mejor profesional y personalmente. Cuando pienso en estos años es inevitable recordar los congresos, y me vienen a la mente los buenos momentos con Leticia y Amparo. Con Leticia comprobé que se puede defender un póster con 2 horas de sueño, y con Amparo que a pesar de tener un manojito de nervios en el estómago antes de presentar tu primera ponencia, había alguien en el público que confiaba en mí. Amparito eres única. Gracias por preocuparos por mí y por acompañarme en este camino. No me olvido de Laura, que sus riñas con Alberto nos daban la vida en los días apagados. De Lucía me llevo esos momentos de hambre extrema después de la hora de comer e ir corriendo a por algo de chocolate, su sonrisa e inocencia. Y Alice, Bojana y Lejla, tres chicas estupendas, que estando lejos de su casa vinieron con unas ganas enormes de aprender.

Ale, gracias por poner un punto de sensatez a mi locura, a la locura de hacer un doctorado. Sin tu apoyo no hubiera podido sacarlo adelante. Me has enseñado a vivir los sueños y a hacerlos realidad. Gracias por recordarme todos los días que debo creer en mí. Me has visto llorar de alegría, de impotencia y de cansancio, y siempre has sabido

sacarme una sonrisa. Eres el único fuera del laboratorio que ha querido aprender (quizá un poco forzado) lo que es GATA, un “ratón *flox/flox*”, una célula estrellada, un ChIP, el microtomo, sonicar....y un largo etcétera. Gracias por acompañarme a La Cartuja a dejar a los ratones en ayunas, o a las tantas de la noche a quitar una placa de qPCR después de cenar en casa. Eres el mejor compañero de vida, de viaje y de aventuras. Te quiero.

También quiero darle las gracias a mis suegros y a mis cuñados. A Annie por cuidarme como una madre. A José por saber escuchar y a enseñarme que, aunque la vida a veces sea injusta, hay que hacerle frente y reponerse. Y a Raquel y a Daniel por su cariño incondicional.

María, Ale y Silvia gracias por aguantar todas mis quejas, que no han sido pocas. María gracias por estar a mi lado desde que era una estudiante en Reina Mercedes, por venir a mis fiestas de Halloween aun sin gustarte, por preocuparte por mí en la lejanía y perdona por haber frustrado tus vacaciones a Madrid mientras escribía la tesis, sé que me sabrás perdonar. Ale y Silvia, no pude arrastraros al otro lado del charco, pero tengo la suerte de haberos traído hasta Madrid; y aun viviendo en la misma ciudad, os echo de menos. Gracias por esas hamburguesas del Nickel, por los findes en la Sierra todos juntos comiendo castañas y boniatos, por cobijarnos al llegar a Madrid con los brazos abiertos y por animarme cada día diciéndome que ya quedaba poco, aunque quedara media tesis por escribir.

Por último, a mi familia, quien os iba a decir 13 años atrás, que *aniria a parar* al mismo sitio donde de pequeña correteaba feliz durante la Expo 92'. A mi hermano Fran, sé que mis alegrías son las tuyas también. Mama y Papa, gracias por haberme enseñado a que trabajando y con esfuerzo todo se consigue en la vida. Por haberme ayudado siempre en mis estudios, apoyando incondicionalmente todas las decisiones que he tomado. Por aguantar mis malos días, los no tan buenos, o aquellos en los que no tenía fuerzas ni para levantar el teléfono. Por hacerme ver que soy más fuerte de lo que creía ser. Gracias por ser unos padres de los que sentirse orgullosa como hija.

Gracias a todos.

Septiembre, 2019

ABREVIATURAS

A

ABC	Área bajo la curva
Abcc8	<i>ATP binding cassette subfamily C member 8</i>
Actb	β -actin
Ad-Cre	Adenovirus-Cre
Ad-GFP	Adenovirus-GFP
ADM	<i>Acino-ductal metaplasia</i> (metaplasia acino-ductal)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina difosfato
AGS	<i>Gastric adenocarcinoma cell line</i>
Akt	<i>Serine/Threonine Kinase</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Arx	<i>Aristaless related homeobox</i>
Ascl1	<i>Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATPasa-HK⁺	Bomba ATPasa de intercambio hidrógeno-potasio

B

β-gal	β -galactosidasa
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BMPR1A	<i>Bone morphogenic protein receptor 1 α</i>

BSA *Bovin Serum Albumin*

C

C Colon

Ca Calcio

CABIMER Centro Andaluz de Biología y Medicina Regenerativa

Cacna1c *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C*

Cdx2 *Caudal type homeobox 2*

Ce Ciego

CEB Centro de Estudios Biosanitarios

ChIP-Seq *Chromatin immunoprecipitation sequencing* (secuenciación de la inmunoprecipitación de cromatina)

CHOP *C/EBP Homologous Protein*

CITIUS Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla

CNIO Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

Cox6a2 *Cytochrome c Oxidase Subunit 6A2*

Cre *Cyclation recombination enzyme*

CRISPR/Cas9 *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats CRISPR-associated protein 9*

CS *Carnegie stage* (estadio embrionario humano de Carnegie)

CTE Cadena de transporte de electrones

Ctrl Control

Cyp4f39 *Cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 39*

D

D Duodeno

DA Dominio de activación

DAPI 4 ',6-diamino-2-fenilindol

DBA *Dolichos biflorus agglutinin* (lectina)

DKO Doble *knockout* condicional (*Gata4*^{*flox/flox*}; *Gata6*^{*flox/flox*}; *Pdx1-Cre*)

DMEM *Dulbecco's modified eagle medium*

DMG *Diabetes mellitus* gestacional

DMN	<i>Diabetes mellitus neonatal</i>
DMNT	<i>Diabetes mellitus neonatal transitoria</i>
DMNP	<i>Diabetes mellitus neonatal permanente</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DMT1	<i>Diabetes mellitus tipo1</i>
DMT2	<i>Diabetes mellitus tipo2</i>
dsDNA	<i>Double-stranded deoxyribonucleic acid</i>

E

E	Estadio embrionario
E-cadh	E-cadherina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eIF2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERt	<i>Estrogen receptor</i>
Es	Esófago
eYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>

F

FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Suero fetal bovino)
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Fgfr2	<i>Fibroblast Growth Factor receptor 2</i>
Fgfr10	<i>Fibroblast Growth Factor receptor 10</i>
FOG1	<i>Friend of GATA 1</i>
FoxA1	<i>Forkhead Box A1</i>
FoxA2	<i>Forkhead Box A2</i>
FoxA3	<i>Forkhead Box A3</i>
FoxO1	<i>Forkhead Box O1</i>

FoxQ1	<i>Forkhead Box Q1</i>
FS	<i>Forestomach</i>
FT	Factor de transcripción

G

G	<i>Gauge</i>
G4KO	<i>Gata4</i> knockout condicional (<i>Gata4^{flox/flox}; Pdx1-Cre</i>)
G6KO	<i>Gata6</i> knockout condicional (<i>Gata6^{flox/flox}; Pdx1-Cre</i>)
Gata1	<i>GATA binding protein 1</i>
Gata2	<i>GATA binding protein 2</i>
Gata3	<i>GATA binding protein 3</i>
Gata4	<i>GATA binding protein 4</i>
Gata5	<i>GATA binding protein 5</i>
Gata6	<i>GATA binding protein 6</i>
Gcg	Glucagón
Gck	Glucoquinasa
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glis3	<i>GLIS Family Zinc Finger 3</i>
Gluc	Glucagón
Glut1	<i>Glucose transporter 1</i>
Glut2	<i>Glucose transporter 2</i>
GSIS	<i>Glucose-stimulated insulin secretion</i> (secreción de insulina estimulada por glucosa)
GTT	<i>Intraperitoneal glucose tolerance test</i> (test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa)

H

H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H&E	Hematoxilina y eosina
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEK293T	<i>Human embryonic kidney SV40 large T antigen cell line</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
Hes1	<i>Hes Family BHLH Transcription Factor 1</i>

hESC	<i>Human embryonic stem cells</i>
Hh	<i>Hedgehog</i>
Hhex	<i>Hematopoietically expressed homeobox</i>
HMGA1	<i>High Mobility Group AT-Hook 1</i>
Hnf1α	<i>Hepatocyte nuclear factor 1α</i>
Hnf4α	<i>Hepatocyte nuclear factor 4α</i>
Hnf4β	<i>Hepatocyte nuclear factor 4β</i>
HNf4G	<i>Hepatocyte nuclear factor 4γ</i>
HNF6	<i>Hepatocyte nuclear factor 6</i>
HOXA5	<i>Homeobox A5</i>
hPSC	<i>Human pluripotent stem cells</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase (Peroxidasa de rábano)</i>
HS	<i>Hindstomach</i>
HUVR-IBIS	Hospital Universitario Virgen del Rocío - Instituto de Biomedicina de Sevilla

I

I	Íleon
IF	Inmunofluorescencia
IFU	<i>Infectious units</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry (Inmunohistoquímica)</i>
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
ITT	<i>Intraperitoneal insulin tolerance test (Test intraperitoneal de tolerancia a la insulina)</i>
Ins	Insulina
Ins1	<i>Insulin I</i>
Ins2	<i>Insulin II</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric oxide synthase</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
IRE1α	<i>Inositol-requiring protein-1 α</i>
Irs2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
ISL1	<i>Insulin gene enhancer protein ISL-1</i>

J

J Yeyuno

K

K Potasio

Kb Kilo bases

kDa Kilo Dalton

Ki Knock-in

KO Knockout (gen anulado)

Krt14 Cytokeratin-14

L

LacZ Operon lac

LAS Leica Applicattion Suite

LAS AF Leica Applicattion Suite Advanced Fluorescence

LoxP Locus X-over P1

M

MACS1 Medium-Chain Acyl-CoA Synthetase

MafA V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A

MafB V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog B

MET Microscopía electrónica de transmisión

MIDY Mutant INS-gene induced diabetes of youth

Mist1 Basic Helix-loop Helix Family Member α15

Mnx1 Motor and pancreas homeobox 1

MODY Maturity-onset diabetes of the young (diabetes instaurada en jóvenes con patrón de diabetes en adultos)

MPCs Multipotent Progenitor Cells (Células progenitoras multipotentes)

mTOR mammalian target of rapamycin

mTORC1 mammalian target of rapamycin complex 1

mTORC2 mammalian target of rapamycin complex 2

mut Mutante

MUC5AC	<i>Mucin 5AC</i>
Myt1	<i>Myelin Transcription Factor 1</i>

N

NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide reduced</i>
NeuroD1	<i>Neurogenic differentiation factor 1</i>
Ngn3	<i>Neurogenin3</i>
Nkx2.2	<i>NK2 homeobox 2</i>
Nkx3.2	<i>NK3 homeobox 2</i>
Nkx6.1	<i>NK6 homeobox 1</i>
Nkx6.2	<i>NK6 homeobox 2</i>
NO	Óxido nítrico
NR5A2	<i>Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2</i>

O

O₂⁻	Superóxido
OH[·]	Radical hidroxilo
Onecut1	<i>One cut homeobox 1</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO⁻	Peroxinitrito

P

P1	Día 1 postnatal
P/S	<i>Penicillin/Streptomycin</i> (Penicilina/Estreptomicina)
Pax4	<i>Paired box gene 4</i>
Pax6	<i>Paired box gene 6</i>
Pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline Tween</i>
Pcsk1	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1
Pcsk2	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 2

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<i>Pdx1</i>	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PERK	<i>Protein kinase RNA (PKA)-like ER kinase</i>
PFA	Paraformaldehído
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PP	Polipéptido pancreático
PPARγ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
<i>Prox1</i>	<i>Prospero homeobox 1</i>
<i>Ptf1a</i>	<i>Pancreas-specific transcription factor 1</i>

R

<i>Rbpjl</i>	<i>Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region Like</i>
RE	Retículo endoplásmico
<i>Rfx6</i>	<i>Regulatory Factor X-box binding 6</i>
RLT	<i>RNeasy Lysis Buffer</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> (especies reactivas de nitrógeno)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (especies reactivas de oxígeno)
RT-qPCR	<i>Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (PCR cuantitativa en tiempo real)

S

SCL2A2	<i>Solute Carrier family 2 Member 2</i>
<i>Slc25a12</i>	<i>Solute Carrier Family 25 Member 12</i>
<i>Slc25a22</i>	<i>Solute Carrier Family 25 Member 22</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
<i>Shh</i>	<i>Sonic Hedgehog</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLN	Señal de localización nuclear
SM	<i>Sec1/Munc18</i>
<i>Sma</i>	<i>Smooth muscle α-actin</i> (α -actina del músculo liso)
SNAP-25	<i>Synaptosomal nerve-associated protein of 25 kDa</i>

SNARE	<i>Synaptosomal nerve-associated protein receptor</i>
Sox2	<i>SRY-box2</i>
Sox3	<i>SRY-box 3</i>
Sox17	<i>SRY sex-determining region-Y box 17</i>
Sox9	<i>SRY sex-determining region-Y box 9</i>
Sst	Somatostatina
STZ	Estreptozotocina
sXBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
SUR1	<i>Sulfonylurea receptor 1</i>

T

TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGF-α	<i>Transforming growth factor α</i>
Tris-HCl	<i>Tris Hydrochloride</i>
TTF1	<i>Trefoil factor 1</i>
TTF2	<i>Trefoil factor 2</i>

U

UA	Unidades arbitrarias
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

V

VAMP2	<i>Vesicle-associated membrane protein 2</i>
--------------	--

W

wt	<i>Wild type</i> (silvestre)
-----------	------------------------------

X

Xbp1	<i>X-box binding protein 1</i>
-------------	--------------------------------

Y

YFP *Yellow fluorescence protein*

Z

Zn Zinc

I. INTRODUCCIÓN	7
PARTE A	
1. La diabetes mellitus	9
1.1 Estrategias actuales para la cura de la diabetes mellitus	16
2. El páncreas en mamíferos	17
2.1 Anatomía y función pancreática	17
2.2 Biosíntesis y secreción de la insulina de la célula β	19
2.3 La célula β pancreática en la diabetes tipo 2	23
2.4 Estrés de la célula β en la diabetes tipo 2	24
2.4.1 Estrés del retículo endoplásmico	25
2.4.2 Ruta mTOR	28
2.4.3 Estrés mitocondrial	30
2.4.4 Interacción entre el estrés del retículo endoplásmico y mitocondrial	31
3. Organogénesis pancreática	32
3.1 Especificación del páncreas	36
3.2 Formación de las yemas pancreáticas y de la población MPCs	38
3.3 Formación del páncreas exocrino y endocrino	41
3.3.1 Diferenciación de las células acinares y ductales	42
3.3.2 Diferenciación de las células endocrinas	42
3.4 Diferencias en el desarrollo embrionario pancreático entre ratones y humanos	44
4. Factores de transcripción GATA	46
4.1 Expresión y función de los factores GATA en la organogénesis pancreática	48
4.2 Anomalías pancreáticas en humanos asociadas a mutaciones en los factores GATA	51
4.3 Expresión y función de los factores GATA en el páncreas humano: estudio <i>in vitro</i> de diferenciación de células madre pluripotentes humanas a células β pancreáticas	53

PARTE B	
5. Arquitectura y función del estómago en mamíferos	57
6. Organogénesis del estómago	60
6.1 Especificación gástrica	61
6.2 Regionalización gástrica	62
7. Definición del límite gástrico anteroposterior	64
8. Límites de expresión génica entre el estómago y órganos adyacentes	65
9. Morfogénesis del epitelio gástrico	65
9.1 Diferenciación celular del epitelio gástrico glandular	67
10. Importancia del factor de transcripción GATA4 en el epitelio gástrico glandular	69
11. Formación del páncreas heterotópico en el sistema digestivo	72
11.1 Características histopatológicas	73
11.2 Prevalencia y sintomatología	73
11.3 Localización	74
11.4 Características embriológicas y teorías del origen	75
11.5 Mutaciones génicas que conducen a la heterotopia pancreática	75
II. OBJETIVOS	79
III. MATERIALES Y MÉTODOS	85
1. Animales de experimentación	87
1.1 Animalario y protocolos de manipulación de animales	87
1.2 Líneas de ratones transgénicos <i>floxeados</i>	88
1.2.1 <i>Gata4</i> ^{<i>flox/flox</i>}	88
1.2.2 <i>Gata6</i> ^{<i>flox/flox</i>}	88
1.3 Líneas de ratón transgénicos con la recombinasa Cre	88
1.3.1 <i>Pdx1-Cre</i>	88
1.3.2 <i>Ptf1a-Cre</i>	89
1.4 Generación de ratones <i>Gata4</i> y <i>Gata6</i> <i>knockout</i> condicionales	89
1.5 Líneas de ratones con genes reporteros	91
1.5.1 <i>Pdx1-LacZ</i>	91
1.5.2 <i>Rosa26R-eYFP</i>	92

1.6 Genotipado de ratones	92
1.6.1 Extracción de ADN genómico	92
1.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	93
2. Líneas celulares	95
2.1 HEK297T	95
2.1.1 Amplificación de adenovirus	96
2.1.2 Titulación de adenovirus	96
2.1 AGS	96
3. Aislamiento de islotes de Langerhans	97
3.1 Aislamiento de islotes pancreáticos humanos	97
3.2 Aislamiento de islotes pancreáticos de ratón	97
4. Obtención, procesamiento y montaje de tejidos	97
4.1 Obtención de tejido pancreático de ratones	97
4.2 Obtención de tejido gástrico de ratones	98
4.3 Obtención de biopsias gástricas y pancreáticas humanas	98
4.4 Fijación, procesamiento y montaje de tejidos	99
4.5 Corte de tejidos en microtomo	99
5. Tinciones con hematoxilina y eosina	100
6. Técnicas de inmunodetección	101
6.1 Inmunofluorescencia	101
6.1.1 Inmunofluorescencia en cortes histológicos	101
6.1.1 Inmunofluorescencia en líneas celulares	102
6.2 Inmunohistoquímica	103
6.3 Amplificación de la señal de fluorescencia	104
6.4 Lista de anticuerpos	104
7. Captura de imágenes	105
7.1 Microscopía vertical de fluorescencia Leica AF6000	105
7.2 Microscopía automática de fluorescencia Nikon NiE-Eclipse	106
7.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET)	106
8. Cuantificación de transcritos de ARN mensajero por PCR cuantitativa	106
8.1 Extracción de ARN total	106
8.2 Reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR)	107
8.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR)	107
8.4 Lista de oligonucleótidos y sondas Taqman	108

9. Microarray	108
10. Ensayos <i>in vivo</i>	109
10.1 Test de tolerancia a la glucosa (GTT)	109
10.2 Niveles de insulina en plasma	110
10.3 Niveles de insulina, proinsulina y péptido C en plasma	110
10.4 Medida de la actividad amilasa en plasma	111
11. Ensayos <i>in vitro</i>	111
11.1 Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)	111
11.1.1 siRNA GATA4	111
11.1.2 siRNA GATA6	111
11.2 Infección con adenovirus	112
11.3 Electrofisiología de islotes aislados	113
11.4 Respuesta de secreción de insulina <i>in vitro</i> de islotes aislados	113
11.5 Contenido de insulina total de islotes aislados	113
11.6 Contenido de insulina en páncreas total adulto	114
12. Cuantificaciones	114
12.1 Cuantificación de células apoptóticas y en proliferación	114
12.2 Cuantificación de masa β mediante inmunodetección de insulina	115
12.3 Cuantificación de gránulos de secreción de insulina en la célula β	115
12.4 Cuantificación de células positivas para NGN3 en el páncreas dorsal	115
13. Análisis estadístico	115
IV. RESULTADOS	117
PARTE A	
1. Desarrollo de intolerancia a la glucosa en los ratones deficientes en <i>Gata6</i>	119
2. Reducción del contenido de insulina y defectos en la secreción de los ratones <i>knockout</i> para GATA6	127
3. GATA6 regula la expresión de genes críticos en la biosíntesis y secreción de la insulina	135
4. GATA6 es un regulador directo de la expresión de <i>Pdx1</i> en las células β adultas	138
5. Análisis de las rutas alteradas en los islotes deficientes en <i>Gata6</i>	140

6. Las células β deficientes en <i>Gata6</i> presenta alteraciones ultraestructurales del retículo endoplásmico y de las mitocondrias	141
PARTE B	
1. Defectos morfológicos del epitelio gástrico en ausencia de GATA4	145
2. GATA4 es esencial para el mantenimiento del límite anteroposterior del epitelio gástrico	149
3. GATA4 es necesario para la diferenciación celular del epitelio gástrico glandular	152
4. Formación de páncreas heterotópico en el estómago en ausencia de GATA4	155
4.1 La formación del páncreas heterotópico en los ratones <i>Gata4 knockout</i> es independiente de la ruta Notch y de <i>Ngn3</i>	159
4.2 La inactivación de GATA4 en el <i>antrum</i> del estómago es esencial para la formación del páncreas heterotópico	161
5. El epitelio gástrico glandular de los ratones <i>Gata4 knockout</i> expresan marcadores pancreáticos	163
6. La presencia de páncreas ectópico en humanos se asocia a una disminución de la expresión de <i>GATA4</i>	165
V. DISCUSIÓN	167
VI. CONCLUSIONES	185
VII. BIBLIOGRAFÍA	189
VIII. ANEXOS	223

I. INTRODUCCIÓN

PARTE A

1. La diabetes mellitus

La *diabetes mellitus* es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por el aumento prolongado en el tiempo de los niveles de azúcar en el torrente sanguíneo, proceso llamado hiperglucemia. El órgano principal encargado de mantener los niveles de azúcar correctos en la sangre es el páncreas mediante la secreción de la hormona insulina. Para garantizar una función normal, el cuerpo humano depende de un control estricto de sus niveles de glucosa en sangre. Esto se logra mediante una red altamente especializada de varias hormonas y neuropéptidos liberados principalmente por el cerebro, el páncreas, el hígado, el intestino, así como por el tejido adiposo y muscular. Dentro de esta red, el páncreas es un órgano que juega un papel clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa. El páncreas mantiene los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango muy estrecho (4–6 mM). Estos niveles se mantienen mediante las acciones opuestas y equilibradas de dos hormonas, la insulina y el glucagón.

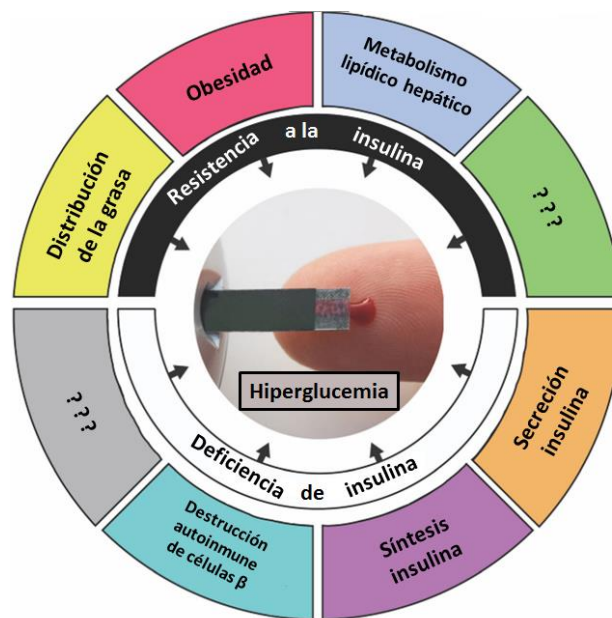


Figura 1. Factores que contribuyen a la hiperglucemia. Las causas que provocan la hiperglucemia se pueden separar dependiendo si provocan la deficiencia de la insulina o la resistencia a la insulina. Imagen modificada de Udler, 2019.

Las células β secretan insulina en respuesta a niveles altos de glucosa en sangre, como ocurre después de la ingesta de comida y la absorción de sus nutrientes. La insulina se libera en el torrente sanguíneo y se une a su receptor que se encuentra en la mayoría de los tejidos, pero particularmente en las células hepáticas, musculares y adiposas para facilitar la absorción y el almacenamiento de glucosa (Jouvet and Estall, 2017). Después de acoplarse a su receptor en el músculo y el tejido adiposo, la insulina permite la absorción de glucosa en estos tejidos y por lo tanto, reduce los niveles de glucosa en sangre (Kohn *et al.*, 1996; Khan and Pessin, 2002). Durante el sueño o entre comidas, cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, se libera glucagón para promover la glucogenólisis hepática (Komatsu *et al.*, 2013). La función del glucagón es aumentar los niveles de glucosa en sangre, mientras que la insulina los disminuye.

Según la Federación Internacional de Diabetes, en 2017, se estima que había ~425 millones de personas diagnosticados con *diabetes mellitus* en todo el mundo, una prevalencia del 8,8%, que se prevé que aumente hasta 62 millones (9,9%) para 2045. La hiperglucemia crónica provoca alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas y a largo plazo produce disfunción y fallo de varios órganos, especialmente los ojos, riñones, sistema nervioso, corazón y vasos sanguíneos (Thomas and Philipson, 2015). La tasa de mortalidad de esta enfermedad se estima en alrededor de 4 millones al año para todos los grupos de edad a nivel mundial, lo que equivale a una muerte cada 8 segundos. Aproximadamente el 8% de los niños y el 26% de los adultos jóvenes tienen *diabetes mellitus* en el mundo. El costo económico para el tratamiento de la diabetes y

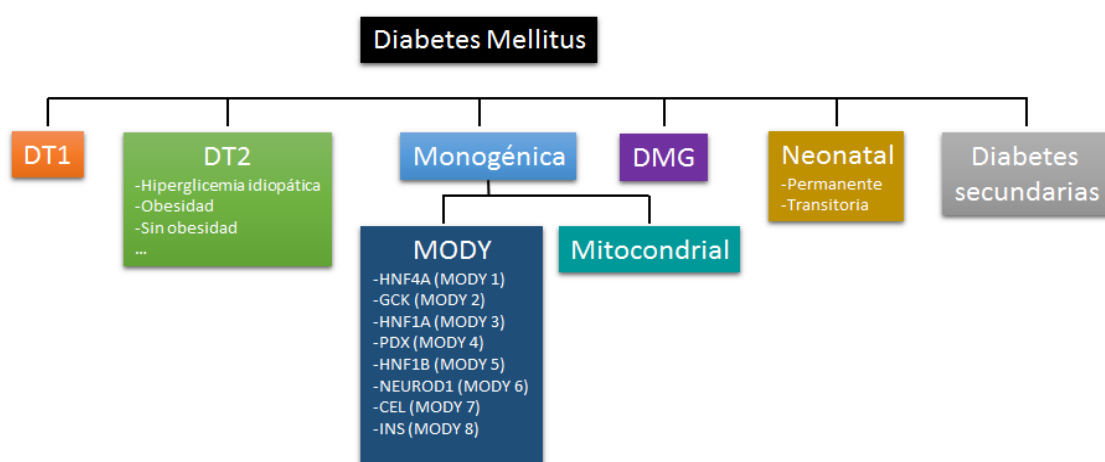


Figura 2. Clasificación de los principales tipos de diabetes mellitus.

las enfermedades asociadas representan una fuerte carga en el sistema sanitario mundial (International Diabetes Federation, 2017).

Los criterios para el diagnóstico de la diabetes se han ido actualizando a lo largo del tiempo, pero según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la diabetes se diagnostica cuando se cumplen uno o más de los siguientes criterios: valores de glucosa en plasma en ayunas mayores de 126 mg/dl, o valores de glucosa en plasma mayores de 200 mg/dl tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g, o un nivel de glucosa al azar mayor de 200 mg/dl o valores de la hemoglobina glucosilada a partir de 6,5%.

La intolerancia a la glucosa, una condición de hiperglucemia intermedia, es considerada por la OMS como el punto de partida para determinar una mayor predisposición y riesgo de desarrollar diabetes. Para el diagnóstico de la intolerancia a la glucosa se deben cumplir ambos de los siguientes criterios: niveles de la glucosa en plasma en ayunas mayores de 126 mg/dl y valores de glucosa en plasma entre 140 y 200 mg/dl tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g. Se considera que los niveles de glucosa en ayunas están alterados cuando existen valores entre 110 mg / dL y 125 mg / dL y tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g valores mayor de 140 mg/dl. Estas categorías, intolerancia a la glucosa y alteración de la glucosa en ayunas, así como un valor de hemoglobina glucosilada entre 5,7% y 6,4% se asocian con un mayor riesgo de desarrollo de diabetes y a menudo se conoce como un estado de prediabetes (International Diabetes Federation, 2017).

La clasificación y el diagnóstico de la diabetes son complejos y han sido tema de debate y revisiones a lo largo de mucho tiempo. Varios factores pueden desencadenar la acumulación de altos niveles de glucosa, como la autodestrucción de las células β , la disfunción del metabolismo lipídico o la obesidad, produciéndose por defectos en la producción y secreción de insulina de las células β pancreáticas, por resistencia a la insulina de los tejidos periféricos o por ambas (Fig.1). Actualmente se consideran tres tipos principales de diabetes: *diabetes mellitus* tipo 1 (DMT1), *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) y *diabetes mellitus* gestacional (DMG). También existen otros tipos de diabetes

menos frecuentes como la diabetes monogénica, la diabetes neonatal y otras formas de diabetes secundarias como consecuencia de otras patologías (Fig. 2).

En la *diabetes mellitus* tipo 1 (DMT1), la causa es una deficiencia absoluta en la producción de insulina. Esta forma de diabetes, antiguamente llamada dependiente de insulina o diabetes juvenil, representa solo del 5 al 10% de las personas con diabetes. Resulta de una destrucción autoinmune de las células β . En esta forma de diabetes, la tasa de destrucción de células β es bastante variable, siendo más rápida en bebés y en niños, y más lenta en adultos. El debut de la DMT1 ocurre comúnmente en la infancia y en la adolescencia, pero también puede aparecer a edades más adultas. Los principales síntomas de la DMT1 son sed anormal y boca seca, micción frecuente, fatiga, pérdida de peso repentina y visión borrosa (Canivell and Gomis, 2014).

La *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) anteriormente conocida como "*diabetes mellitus* no dependiente de insulina" o "diabetes de inicio en adultos", representa el 90-95% de los casos. La DMT2 se desarrolla cuando la célula β no logra compensar adecuadamente la resistencia a la insulina que ofrecen las células de los tejidos periféricos. A medida que la enfermedad progresa, también puede desarrollarse un defecto en la síntesis y

Estadios Tipo	Normoglucemia	Hiperglucemia			
	Regulación normal de la glucosa	Intolerancia a la glucosa/ Glucosa en ayunas alterada (Prediabetes)	Diabetes Mellitus		
			No requiere insulina	Requiere insulina como control	Requiere insulina para sobrevivir
Tipo 1					
Tipo 2					
Otros tipos					
Diabetes gestacional					

Figura 3. Esquema representativo de los trastornos en la glucemia, tipos y etapas. Imagen extraída de Canivell & Gomis, 2014.

secreción de la insulina. Esta forma de diabetes está fuertemente asociada a malos hábitos de salud como la ingesta excesiva de calorías y una mala alimentación, peso corporal excesivo y la falta de actividad física. Los principales síntomas de la DMT2 son hormigueo en manos y pies, infecciones fúngicas en la piel recurrentes y lentitud en la curación de heridas, además de los síntomas ya mencionados en la DMT1 (International Diabetes Federation, 2017).

Previo al desarrollo de la DMT2 existe un grado de hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en varios tejidos, pero sin desarrollar aún síntomas clínicos. El grado de hiperglucemia puede cambiar con el tiempo. Dependiendo de la progresión de la enfermedad puede causar alteración de los niveles de glucosa en ayunas y/o intolerancia a la glucosa sin cumplir con los criterios para ser diagnosticado como diabetes (Canivell and Gomis, 2014). Hay estudios que respaldan que existe una predisposición genética al fallo de las células β (Bell and Polonsky, 2001). Otros factores no genéticos como la glucotoxicidad y/o la lipotoxicidad también conllevan un mal funcionamiento de la célula β . En condiciones de hiperglucemia, la célula β aumenta su capacidad funcional para contrarrestar la hiperglucemia aumentando los niveles de producción de insulina y de gránulos secretores. Tras un tiempo de hiperglucemia crónica, la célula β queda exhausta y deja de funcionar. En condiciones de lipotoxicidad, los aumentos crónicos en los niveles de ácidos grasos libres disminuyen la conversión de proinsulina en insulina, disminuyéndose por tanto la secreción de insulina (Del Prato, 2009).

La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes son obesos, y la obesidad en sí misma causa cierto grado de resistencia a la insulina. Otros pacientes no presentan obesidad según los criterios de peso tradicionales, pero pueden tener un mayor porcentaje de grasa corporal distribuida en la región abdominal. Esta forma de diabetes con frecuencia no se diagnostica desde un inicio porque la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y, en etapas más tempranas, a menudo no es lo suficientemente grave como para que el paciente note alguno de los síntomas clásicos de la diabetes (Canivell and Gomis, 2014). De hecho, en la práctica, para la DMT2 se realiza un diagnóstico de exclusión. Por lo tanto, no es sorprendente que la DMT2 sea una condición altamente

heterogénea con pacientes que varían considerablemente en la presentación clínica y en la respuesta al tratamiento (Fig. 3) (Udler, 2019).

El grado de dependencia de la insulina exógena varía según los pacientes con DMT2. En algunas personas con diabetes, se puede lograr un control glucémico adecuado con reducción de peso, ejercicio y/o agentes hiperglucemiantes orales, como la metformina. Estas personas, por lo tanto, no requieren insulina exógena. Otros individuos que tienen algo de secreción residual de insulina, pero requieren insulina exógena para un control glucémico adecuado, pueden sobrevivir sin ella. El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. A menudo se asocia con una fuerte predisposición genética, sin embargo, es compleja y no está completamente definida (Fig. 3) (Canivell and Gomis, 2014).

La diabetes gestacional (DMG) se define como la diabetes diagnosticada por primera vez en el primer o segundo trimestre del embarazo, sin antecedentes de padecer una diabetes tipo 1 o 2. Presentan niveles altos de glucosa en sangre ya que no producen suficiente insulina. Después del embarazo, el riesgo materno de padecer DMT2 y enfermedades cardiovasculares aumenta, por lo que el seguimiento continuo y una intervención temprana para la intolerancia a la glucosa son cruciales. En 2017, se estimó que 21,3 millones de nacimientos (16,2%) en todo el mundo se vieron afectados por hiperglucemia en el embarazo, y de estos, 86,4% se debieron a la DMG (International Diabetes Federation, 2017).

En la diabetes monogénica o MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) se engloba a un grupo heterogéneo de trastornos causados por mutaciones en genes importantes para el desarrollo, la función y la regulación de las células β , la detección de la glucosa y en el gen de la insulina (Bell and Polonsky, 2001; Fajans, Bell and Polonsky, 2001). Se puede reconocer una diabetes MODY si se trata de una afección tipo DMT2 y ocurre en 2, 3 o más generaciones con un patrón de herencia autosómica dominante. Sin embargo, pueden ocurrir casos *de novo*. Hasta la fecha se han identificado once tipos de MODY,

cada uno caracterizado por mutaciones en genes que intervienen durante el desarrollo embrionario del páncreas y que causan defectos en el adulto (Tabla 1).

MODY	GEN	NOMBRE DEL GEN	DEFECTO
MODY1	<i>HNF4α</i>	<i>Hepatocyte nuclear factor-4α</i>	Secreción de insulina y masa β
MODY2	<i>GCK</i>	<i>Glucokinase</i>	Detección de glucosa en célula β y almacenamiento de glucosa en el hígado
MODY3	<i>HNF1α</i>	<i>Hepatocyte nuclear factor-1α</i>	Secreción de insulina y masa β
MODY4	<i>PDX1</i>	<i>Pancreatic/duodenum homeobox protein 1</i>	Regulación transcripcional y función de las células β
MODY5	<i>HNF1β</i>	<i>Hepatocyte nuclear factor-1β</i>	Secreción de insulina y masa β. Quistes renales y síndrome diabético
MODY6	<i>NEUROD1</i>	<i>Neurogenic differentiation 1</i>	Regulación transcripcional y función de las células β
MODY7	<i>KLF11</i>	<i>Kruppel-like-factor 11</i>	Expresión de la insulina por defectos en la activación del promotor
MODY8	<i>CEL</i>	<i>Carboxyl-ester lipase</i>	Función lipasa en células acinares. Disfunción del páncreas exocrino
MODY9	<i>PAX4</i>	<i>Paired box gene 4</i>	Represión de la actividad de los promotores de la insulina y el glucagón
MODY10	<i>INS</i>	<i>Insulin</i>	Procesamiento de la insulina
MODY11	<i>BLK</i>	<i>Tyrosine kinase, B-lymphocyte specific</i>	Función de la célula β. Secreción y síntesis de insulina

Tabla 1. Genes implicados en la diabetes mellitus tipo MODY. Extraída y modificada de Mastracci & Sussel, 2014.

Otro tipo de diabetes monogénica es la diabetes mitocondrial y tiene transmisión materna. La enfermedad se asocia con un rango de mutaciones en el ADN mitocondrial. Se estima que esta mutación representa del 0,2% al 2% de los casos de diabetes (Maassen *et al.*, 2006).

La *diabetes mellitus* neonatal (DMN) se define como la diabetes que tiene inicio antes de aproximadamente los 6 meses de edad. Realmente el término abarca diabetes de cualquier etiología, pero se reconoce que la diabetes diagnosticada antes de los 6 meses es casi siempre de naturaleza monogénica, aunque puede ser (rara vez) autoinmune. Los subtipos de DMN incluyen la transitoria (DMNT) y la permanente (DMNP). La DMNT a menudo se desarrolla dentro de las primeras semanas de vida y se resuelve a los pocos meses de edad. Sin embargo, ocurre una recaída en la adolescencia o la edad adulta en aproximadamente el 50% de los casos. La DMNP suele asociarse con hipoplasia pancreática severa o agenesia pancreática debido a fallos en el desarrollo embrionario del páncreas (Greeley *et al.*, 2011; Thomas and Philipson, 2015).

1.1 Estrategias actuales para la cura de la diabetes mellitus

Una de las primeras estrategias para la cura de la diabetes fue el trasplante de páncreas total, que comenzó a practicarse en humanos en 1966, con poco éxito. Progresivamente se introdujeron mejoras, como la mayor eficiencia de los medicamentos inmunosupresores, aumentando el número de trasplantados. El trasplante de páncreas puede proporcionar la independencia a la insulina, reducir las complicaciones de la diabetes y mejorar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, presenta muchos efectos secundarios y para evitar el rechazo del injerto se deben emplear fármacos inmunosupresores de por vida. Sin embargo, en los últimos años ha descendido el número de pacientes sometidos a esta cirugía debido a los buenos resultados obtenidos con otros tratamientos que presentan menos complicaciones, como las bombas de insulina (Dean *et al.*, 2017).

En 2004, la Asociación Americana de la Diabetes enumeró los criterios para la selección de los pacientes candidatos al trasplante: i) pacientes con enfermedad renal en etapa terminal que han tenido o planean recibir un trasplante de riñón, y ii) pacientes sin enfermedad renal con antecedentes de complicaciones metabólicas graves, agudas y frecuentes (hipoglucemia, hiperglucemia marcada, cetoacidosis), con problemas clínicos con la administración de insulina exógena. Las tres estrategias utilizadas son el trasplante simultáneo de páncreas y riñón, el trasplante del páncreas después de un trasplante de riñón o solo el trasplante de páncreas (Dean *et al.*, 2017; Jenssen, Hartmann and Birkeland, 2017).

Los mejores candidatos al trasplante de páncreas completo serían personas con DMT1 con enfermedad renal terminal con necesidad de un trasplante de riñón. Se considera que el páncreas trasplantado funciona si el paciente es independiente de la administración de insulina. En Estados Unidos se considera que es exitoso si el paciente necesita menos de 0,5 unidades de insulina/kg peso/día durante 90 días consecutivos.

El trasplante de islotes de Langerhans aislados para pacientes con DMT1 surgió como una alternativa al trasplante de páncreas (Shapiro *et al.*, 2000). El trasplante de islotes aislados es menos agresivo y más seguro. Se utilizan islotes procedentes de varios donantes cadavéricos (de 2 a 4), se inyectan a través de la piel, mediante un catéter que

va al hígado y/o pasa a la vena porta que conecta el hígado y el páncreas (Aref *et al.*, 2019). Sin embargo, se obtienen peores resultados que con el trasplante del páncreas total (Shapiro *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2015). A menudo se necesita reinyección de islotes y el paciente está expuesto a antígenos de varios donantes. Actualmente se estudia el utilizar un solo donante y trasplantar menos islotes mejorando las técnicas de recolección de islotes, la purificación y los protocolos que faciliten la supervivencia de los islotes aislados (Bellin *et al.*, 2008; Posselt *et al.*, 2010; Farney, Sutherland and Opara, 2016; Dean *et al.*, 2017). Por lo general, el trasplante del páncreas total es una operación más agresiva que el trasplante de islotes aislados, sin embargo, presenta mayor porcentaje de éxitos.

Actualmente, el objetivo principal en investigación se centra en la generación de células productoras de insulina *in vitro* mediante protocolos de diferenciación para reemplazar las que han sido eliminadas o no llevan a cabo su función correctamente. Para ello, es necesario conocer las señales extracelulares y los reguladores transcripcionales que promueven la generación de células β durante el desarrollo embrionario (Servitja and Ferrer, 2004; Zaret and Grompe, 2008). Este conocimiento puede aprovecharse para producir células productoras de insulina a partir de células multipotentes *in vitro* o mediante la transdiferenciación de células somáticas (Zhou *et al.*, 2008). La identificación de los procesos implicados en la disfuncionalidad de la célula β durante la diabetes también son importantes para la búsqueda de dianas terapéuticas que puedan revertir la enfermedad.

2. El páncreas en mamíferos

2.1 Anatomía y función pancreática

El páncreas es una glándula que cumple dos funciones vitales; una es la producción de enzimas necesarias para la digestión y otra es la producción de hormonas necesarias para la regulación de los niveles de glucosa (Röder *et al.*, 2016).

La parte exocrina del páncreas, que es la que produce las enzimas digestivas, representa el 98% de la masa pancreática y está compuesta por células acinares responsables de la síntesis, almacenamiento y secreción de enzimas digestivas (Husain and Thrower, 2009). Las células exocrinas productoras de enzimas tienen forma cónica y están dispuestas

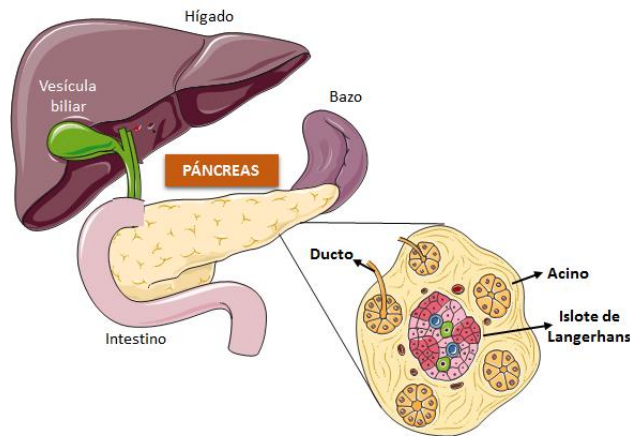


Figura 4. Esquema de la estructura anatómica del páncreas. Figura creada usando plantillas de Servier Medical Art, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

alrededor de una luz central formando acinos. Segregan el jugo pancreático que contiene agua, iones de bicarbonato y una variedad de enzimas, incluyendo

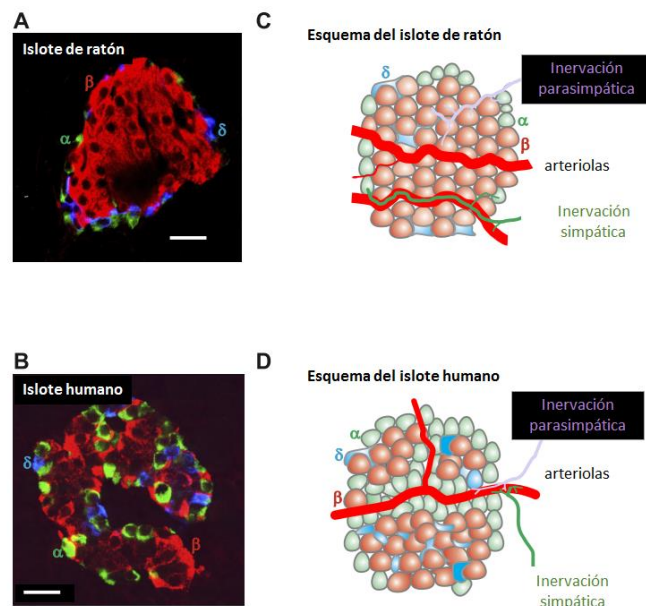


Figura 5. Diferencias citoestructurales entre el islote de ratón y humano. A y B: inmunohistoquímica del islote pancreático de ratón (A) y humano (B) (rojo, insulina; verde, glucagón; azul, somatostatina). Barra de escala: 20 μ m. C y D: esquema de las principales diferencias entre el islote de ratón (C) y el humano (D). En color rojo las células α , en color verde las células β y en color azul las células δ . Imagen modificada de Rorsman & Ashcroft, 2017.

tripsinógeno, quimotripsinógeno, carboxipeptidasas, elastasa, lipasa, fosfolípido A, amilasa, ADNasa y ARNasa. El jugo pancreático se excreta al duodeno a través de los conductos pancreáticos (Fig.4) (Henry *et al.*, 2019).

Langerhans describió por primera vez los pequeños grupos de células endocrinas, formando los llamados islotes de Langerhans, que son pequeñas estructuras dentro del tejido pancreático exocrino y representan solo el 1-2% de todo el órgano (Chandra and Liddle, 2009). La mayoría de los islotes son esféricos; sin embargo, también pueden ser planos o alargados (Henry *et al.*, 2019). Los islotes contienen 5 tipos celulares: α - β - δ - ϵ - y γ (PP). La población principal, las células β representan el 65-80% del total de células, y secretan amilina, péptido C e insulina. Las células α secretan glucagón y representan del 15 al 30% de células del islote. La pequeña proporción de células δ (del 3 al 10%) y células ϵ (<1%) secretan somatostatina y ghrelina, respectivamente. Finalmente, las células γ (PP) producen polipéptidos pancreáticos que actúan localmente dentro del páncreas para autorregular la función endocrina y regular la secreción gastrointestinal, y constituyen del 3 al 5% de las células totales (Katsuura, Asakawa and Inui, 2002; Wierup *et al.*, 2002; Brissova *et al.*, 2005; Kojima *et al.*, 2007).

Aunque los islotes tienen una composición celular similar entre las diferentes especies, su citoarquitectura difiere mucho. En los roedores los islotes están compuestos principalmente por células β ubicadas en el centro con los otros tipos celulares dispuestos en la periferia, sin embargo, en los islotes humanos las células α y β están interconectadas (Fig.5) (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2005).

2.2 Biosíntesis y secreción de la insulina en la célula β

Las células endocrinas secretan sus respectivas hormonas en respuesta a señales externas, como la ingesta de nutrientes o el estrés, a través de vías de señalización humoral, neural u hormonal. El proceso molecular que traduce el estímulo en la liberación de la hormona es por acoplamiento de secreción-estímulo. En las células β , el estímulo principal para la liberación de insulina son los niveles elevados de glucosa en sangre después de la ingesta (Komatsu *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, las células β son el componente principal de los islotes pancreáticos en todas las especies. Son células poligonales y contienen ~ 10.000 gránulos secretores. La insulina se almacena en forma cristalina hexamérica en las vesículas secretoras de las células β (Rorsman and Ashcroft, 2017). Estas células son los principales sensores de glucosa y son esenciales para la homeostasis de la glucosa. Según los requerimientos en la biosíntesis de insulina, se estima que cada célula β produce alrededor de un millón de moléculas de insulina por minuto (Scheuner and Kaufman, 2008).

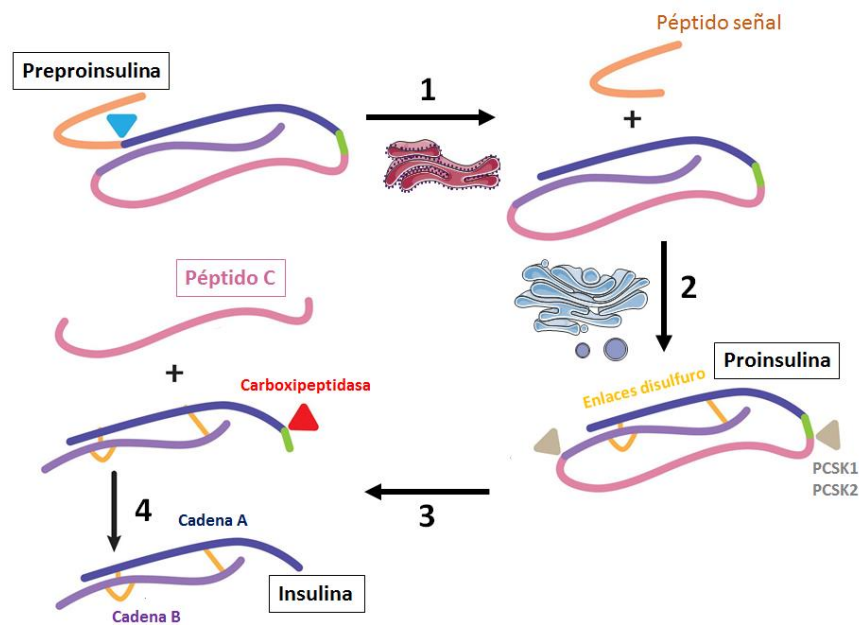


Figura 6. Esquema representativo de las modificaciones postraduccionales de la insulina. 1. La preproinsulina entra en el retículo endoplásmico (RE) donde se escinde el péptido señal y 2. se pliega mediante la formación de tres enlaces disulfuro. Posteriormente se procesa en el RE y forma proinsulina, que es transportada al Golgi donde se empaqueta en gránulos de secreción. La proinsulina se escinde proteolíticamente por PCSK1 o PCSK2 y 3. luego los residuos C-terminales se eliminan por la carboxipeptidasa 4. Este procesamiento da como resultado la insulina madura que consiste en las cadenas A y B unidas por enlaces disulfuro, y el péptido C. Figura creada usando plantillas de Servier Medical Art, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

La mayoría de los animales tienen una sola copia del gen de la insulina, pero los roedores tienen dos genes para la insulina, *Ins1* e *Ins2* (Fu, Gilbert and Liu, 2013). A partir del transcrito del gen de la insulina, se traduce el polipéptido preproinsulina, que entra al retículo endoplásmico (RE), donde se pliega en un entorno oxidante que permite la formación de tres enlaces disulfuro intramoleculares. Posteriormente se procesa mediante escisión en el RE y forma proinsulina, que es transportada al Golgi donde se

empaqueta en gránulos para ser secretadas por vesículas. La proinsulina dentro de los gránulos secretadores se escinde proteolíticamente, inicialmente por la prohormona convertasa 1 (PCSK1) o la prohormona convertasa 2 (PCSK2), y luego los residuos C-terminales se eliminan por la carboxipeptidasa E. Este procesamiento postraduccional produce insulina madura que consiste en las cadenas A y B unidas por enlaces disulfuro más el péptido C que se co-secreta con la insulina (Fig. 6) (Goodge and Hutton, 2000; Hasnain, Prins and McGuckin, 2016; Ramos-Molina, Martin and Lindberg, 2016).

En un individuo sano, la glucosa entra en las células β por difusión facilitada a través del transportador de glucosa GLUT2, también conocido como SLC2A2 (Thorens, 2015). Después, la enzima glucoquinasa (GCK) genera glucosa-6-fosfato, que se metaboliza durante la glucólisis para generar piruvato, NADH y ATP. El metabolismo del piruvato en el ciclo de Krebs genera NADH y FADH₂ que transfieren electrones a la cadena respiratoria mitocondrial para generar ATP. El aumento en la relación ATP/ADP conduce al cierre de los canales de membrana de K⁺ dependientes de ATP, lo que resulta en la despolarización de la membrana plasmática, que a su vez activa un canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje. En consecuencia, la entrada de Ca²⁺ estimula las vesículas de insulina preformadas para fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al torrente sanguíneo, lo que resulta en una secreción de insulina acorde con el aumento de la glucosa extracelular. Esta ruta de secreción es denominada vía de la secreción de insulina estimulada por glucosa (*glucose-stimulated insulin secretion*)(GSIS) (Fig. 7) (Jensen *et al.*, 2008; Muoio and Newgard, 2008; Komatsu *et al.*, 2013).

Existen dos grupos de gránulos de insulina dentro de la célula: un grupo de fácil liberación cerca de la membrana plasmática en el que los gránulos contienen las proteínas SNARE y otras proteínas que facilitan la exocitosis, y un grupo de reserva que carece de estos factores. Se cree que estos dos grupos de vesículas explican la liberación bifásica de la insulina (Wang and Thurmond, 2009; Seino, Shibasaki and Minami, 2011). La primera fase es rápida y de corta duración, alrededor de 5 minutos después del estímulo de la glucosa, y durante esta fase se libera la mayoría de la insulina. En la segunda fase, más sostenida y de mayor duración, la insulina restante es secretada. La insulina se almacena en vesículas que se reclutan cerca de la membrana plasmática

después de la estimulación, de modo que la insulina esté fácilmente disponible (Hao *et al.*, 2005). Las moléculas clave que median la fusión de las vesículas que contienen la insulina madura son las proteínas asociadas al sinaptosoma de 25 kDa (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*) (SNAP-25), la syntaxina-1 y la sinaptobrevina 2, también llamada VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein*), las cuales pertenecen a la superfamilia de las proteínas SNAP (*N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*). Junto con las proteínas Sec1/Munc18 (SM) forman el denominado complejo SNARE. Se ha demostrado que numerosas isoformas de SNARE, incluidas la syntaxina-1, -3 y -4, SNAP-25 y -23, así como las sinaptobrevinas 2 y 3 (VAMP2 y 3) están involucradas en la secreción de la insulina estimulada por glucosa (Leung *et al.*, 2007).

Los canales de K^+ dependientes de ATP son un complejo octamérico formado por cuatro subunidades de la proteína Kir6.2 formando el poro del canal, y cuatro subunidades reguladoras llamadas SUR1 (*regulatory sulfonylurea receptor 1*), codificadas por el gen *Abcc8*. Los islotes nulos para *Abcc8* no secretan insulina en la primera fase y tienen una

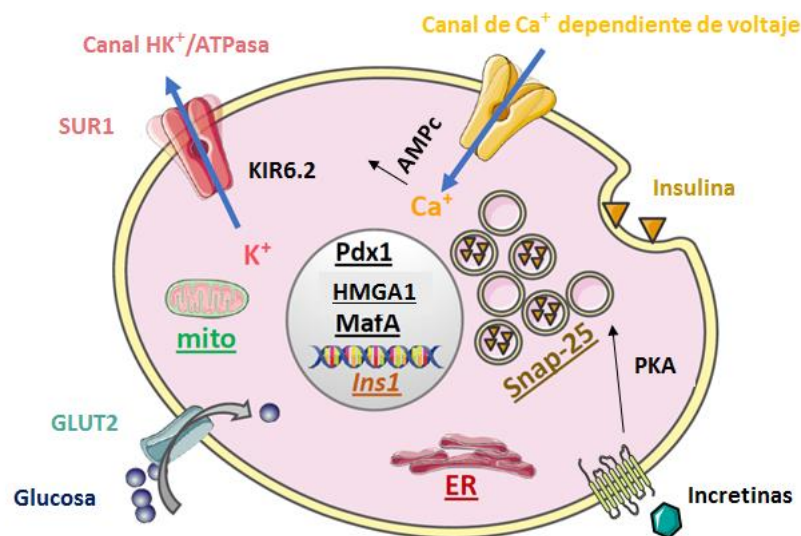


Figura 7. Biosíntesis y secreción de la insulina en las células β . La síntesis de insulina está regulada por la concentración de glucosa extracelular, transportada al interior de la célula β por GLUT2, e impulsa la producción de ATP y el cierre del canal de K^+ . Esto a su vez conduce a la despolarización de la membrana y a la entrada de Ca^{2+} , que impulsa la secreción de los gránulos de insulina. Además, la secreción de insulina se ve reforzada por la activación de las incretinas y la proteína PKA. Tras la estimulación por glucosa, se liberan los gránulos de insulina maduros en la primera fase de secreción, posteriormente se movilizan el resto de los gránulos en la segunda fase de secreción. Figura creada usando plantillas de Servier Medical Art, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

secreción atenuada en la segunda fase. La pérdida de la primera fase conduce a una intolerancia leve a la glucosa (Seghers *et al.*, 2000).

Mientras que la secreción de insulina estimulada por glucosa reduce temporalmente el número de gránulos de insulina almacenados, particularmente los gránulos maduros, la glucosa y las incretinas estimulan la biosíntesis de insulina para reponer los gránulos entre comidas. Varios factores de transcripción que regulan la transcripción de la insulina son sensibles a la glucosa, incluidos PDX1, MAFA y HMGA1, y esto se ve reforzado por la activación de AMPc y la proteína quinasa A (PKA) (Fig. 7) (Andrali *et al.*, 2008; Arcidiacono *et al.*, 2014; Rutter *et al.*, 2015). Además de la estimulación de la transcripción del gen de la insulina, la glucosa también estimula la traducción. El efecto de la estimulación de glucosa en la traducción de insulina es rápido y potente, con un aumento de diez veces la biosíntesis de insulina dentro de los primeros 20 minutos tras el estímulo de la glucosa (Wicksteed *et al.*, 2007). Por lo tanto, la secreción de insulina y la biosíntesis son procesos altamente co-regulados que responden tanto al aumento de la glucosa en sangre como a las señales del tracto intestinal.

2.3 La célula β pancreática en la diabetes tipo 2

La cantidad total de insulina liberada depende del número absoluto de células β en los islotes pancreáticos (masa de células β) y/o de la síntesis de hormona que produce cada una de estas células. La literatura actual sugiere que la masa y la función de las células β contribuyen de diferentes maneras al desarrollo de la diabetes, especialmente en casos con una fase prediabética prolongada (Chen *et al.*, 2017). Las altas concentraciones de glucosa circulante tienen efectos perjudiciales sobre las células β . A este fenómeno se le conoce como glucotoxicidad (Hotamisligil and Erbay, 2008).

En la DMT1, la fase prediabética parece caracterizarse por un deterioro funcional prolongado y gradual, seguido de una disminución rápida de la masa de células β justo antes del inicio de la hiperglucemia. En el caso de la DMT2, las células β tienen una capacidad compensatoria en estadios previos al desarrollo de la enfermedad. En estos individuos, existe un aumento en la producción de insulina a través de la expansión de la masa de células β , contrarrestando la hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. La

masa de células β generalmente aumenta en un 50-90% en sujetos con sobrepeso u obesidad (Meigs *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2017). Una vez se desarrolla la DMT2 se observa una reducción significativa en la masa de células β , además de una bajada en la capacidad de secreción (Garg *et al.*, 2003; Hanley *et al.*, 2010; Inaishi *et al.*, 2016).

El mecanismo subyacentes a la reducción de la masa de células β probablemente sea una tasa mayor de apoptosis (Marchetti *et al.*, 2004). Sin embargo, en la DMT2, la tasa de apoptosis de las células β es relativamente baja y no puede explicar completamente la pérdida de masa β . Recientemente se ha propuesto que una de las causas que subyace al déficit de células β en DMT2 es la desdiferenciación de células β . Las características de la desdiferenciación de células β incluyen la expresión reducida de factores clave de transcripción de células β como PDX1, NKX6.1, MAFA, GLUT2, SUR1 y la re-expresión de factores de transcripción de células endocrinas progenitoras, como Neurogenin3 (*Ngn3*). Estas células desdiferenciadas pierden su identidad de células β y dejan de contribuir al control metabólico de la homeostasis de la glucosa (Talchai *et al.*, 2012; Accili *et al.*, 2016).

Por lo tanto, en ciertas situaciones, la compensación funcional de las células β parece ser insuficiente o deteriorarse en la DMT2, lo que aumenta la carga de trabajo y el estrés de las células β y produce agotamiento funcional, desdiferenciación y finalmente la muerte de las células β .

2.4 Estrés de la célula β en la diabetes tipo 2

Las alteraciones o ineficiencias en la fosforilación oxidativa para producir ATP son claves en la disfunción de las células β y; de hecho, los pacientes con DMT2 tienen la función y morfología mitocondriales alteradas (Anello *et al.*, 2005). Las altas concentraciones de glucosa en la cadena de transporte de electrones (CTE) y el ciclo de Krebs conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Acharya and Ghaskadbi, 2010). Las ROS mitocondriales y otros metabolitos tóxicos, así como el estrés del retículo endoplásmico (RE), causan importantes daños en las células β y pueden conducir a la pérdida de masa β .

Las células β poseen una respuesta adaptativa fundamental para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas en el RE cuando excede la capacidad de plegamiento de este orgánulo. De hecho, el correcto funcionamiento de esta respuesta adaptativa al estrés es vital para la preservar el fenotipo diferenciado de las células β . Fallos en esta maquinaria se asocian con la diabetes y alteraciones en la diferenciación de las células β (Herbert and Laybutt, 2016). La sobrealimentación, la obesidad, la DMT2 y sus trastornos metabólicos relacionados pueden conducir a la acumulación de proteínas mal plegadas, y posteriormente causar estrés del RE (Wang, Yang and Zhang, 2016).

2.4.1 Estrés del retículo endoplásmico

El RE es muy importante para la función de la célula β , ya que es donde se biosintetiza la insulina, y es el orgánulo responsable del correcto plegamiento y clasificación de las proteínas, así como de la señalización y almacenamiento del calcio (Stone *et al.*, 2019). La disfunción o el estrés en el RE está directamente relacionado con la patogénesis de la célula β tanto en la DMT1 como en la DMT2 (O'Sullivan-Murphy and Urano, 2012; Tersey *et al.*, 2012; Engin *et al.*, 2014). Dependiendo de la gravedad o de la duración del estrés, la respuesta del RE puede culminar en la muerte celular de las células β . Las células β responden al estrés del RE a través de la activación de programas transcripcionales y traduccionales destinados a resolver este estrés (Eizirik and Cnop, 2010).

El estrés del RE se define como un desequilibrio entre la capacidad de plegamiento de las proteínas y la demanda funcional en el orgánulo. Este desequilibrio conduce a la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del RE (Cnop *et al.*, 2017).

Para restaurar la homeostasis del RE, las células desencadenan una respuesta al estrés del RE, conocido como la respuesta de proteínas desplegadas (*unfolded protein response*) (UPR). Esta respuesta adaptativa tiene como objetivo aumentar la capacidad funcional del orgánulo y disminuir la llegada de proteínas recién sintetizadas. El primer objetivo se logra mediante la regulación transcripcional para aumentar el número de

enzimas plegadoras y chaperonas, y la expansión del tamaño del RE. El segundo objetivo se alcanza disminuyendo la traducción de proteínas a través de la fosforilación del factor iniciación de la traducción eucariota 2 (eIF2) y la degradación de los ARNm. En eucariotas, esta respuesta adaptativa de la UPR está mediada por tres enzimas unidas a la membrana del RE. Estas proteínas son PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) e IRE-1 α (*inositol-requiring protein-1*) (Ron and Walter, 2007).

La activación de IRE1 conduce a la traducción de sXBP1 (*X-box binding protein 1*). Este factor de transcripción promueve la activación de genes que codifican para enzimas plegadoras y chaperones, y componentes de la maquinaria ERAD (*ER-associated degradation*) para eliminar las proteínas mal plegadas y expandir el compartimento del RE (Pirrot *et al.*, 2007; Hollien and Weissman, 2016).

Estrés del retículo endoplásmico y la respuesta UPR

Las células β son células secretoras y, por lo tanto, poseen un RE bien desarrollado para manejar la gran carga biosintética que debe soportar. Es inevitable que se plieguen mal algunas proteínas en el RE, y los errores en el plegamiento se multiplican con el aumento en la complejidad de las proteínas, por lo que el RE tiene mecanismos bien desarrollados para reconocer y eliminar las proteínas mal plegadas que de otro modo se acumularían (Hasnain, Prins and McGuckin, 2016).

La proinsulina es bastante susceptible al plegamiento incorrecto y se estima que alrededor del 20% de la proinsulina se pliega incorrectamente en una célula β normal, lo que equivale a alrededor de 200.000 moléculas de proinsulina mal plegadas cada minuto (Sun *et al.*, 2015). La respuesta de señalización y transcripcional UPR restaura la homeostasis del RE. En el resto de las células secretoras es probable que haya una activación de UPR casi continuo.

La activación de UPR está regulada principalmente por una chaperona llamada BiP, que normalmente se asocia y mantiene inactiva las tres moléculas principales que inician la vía UPR (IRE1, PERK y ATF6). La UPR tiene tres funciones principales: disminución de la traducción, restauración del correcto plegamiento y la degradación de proteínas mal

plegadas asociada al RE (ERAD) (Walter and Ron, 2011). El estrés severo o prolongado del RE induce inflamación, autofagia y apoptosis.

El objetivo final de la UPR es restaurar la biosíntesis de proteínas del RE, pero paradójicamente, el primer paso es la fosforilación de eIF2a mediada por PERK, que disminuye la traducción de proteínas para aliviar la carga del RE (Harding, Zhang and Ron, 1999). Por lo tanto, la respuesta fisiológica, al mismo tiempo que protege la célula secretora del estrés del RE, puede tener efectos fisiológicos adversos que, en el caso de las células β , se traduce en una reducción en la producción de insulina y, por lo tanto, el desarrollo de hiperglucemia. Además de la inhibición de la traducción, PERK promueve la expresión de múltiples genes mediante la activación de factores de transcripción como ATF4 y la CHOP (Schröder and Kaufman, 2006), estimulando la apoptosis (Marciniak *et al.*, 2004).

A menudo, la activación de la UPR se utiliza como unidad de medida del estrés del RE, y debido a que la UPR puede inducir inflamación y apoptosis, existe una tendencia a equiparar la activación de la UPR con consecuencias perjudiciales para la célula. Sin embargo, se requiere que la UPR sea completamente funcional para mantener la homeostasis normal en las células β (Hasnain, Prins and McGuckin, 2016).

Estrés del retículo endoplásmico y la diabetes mellitus

Existen evidencias del estrés en el RE en las células β en la DMT1 y DMT2 (Eizirik, Cardozo and Cnop, 2008; Cnop, Foufelle and Velloso, 2012). Cualquier mutación que conduzca a un plegamiento incorrecto de las proteínas en el RE puede teóricamente provocar estrés en el RE, muerte de las células β y diabetes.

La evidencia más directa de que el mal plegamiento de las proteínas y el estrés del RE en las células β pueden causar diabetes proviene de un síndrome llamado MIDY (*mutant INS-gene induced diabetes of youth*) que presenta mutaciones de plegamiento erróneo en el gen *INS* con 30 mutaciones dominantes documentadas hasta la fecha (Liu *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015). El mecanismo celular y molecular subyacente se ha estudiado más ampliamente en el modelo de ratón Akita con un alelo *Ins2* mutado (Yoshioka *et al.*, 1997). A pesar de portar una copia silvestre de *Ins2* y dos copias silvestres de *Ins1*,

desarrollan diabetes de forma temprana debido a la apoptosis progresiva de las células β asociada con el plegamiento erróneo de la proinsulina (Seiichi *et al.*, 2002).

Varias formas de diabetes monogénica, incluida la diabetes tipo MODY, posiblemente están asociadas con una respuesta alterada al estrés del RE. Mutaciones en los genes MODY como *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *PDX1* y *PAX4* entre otros, son esenciales en la regulación del estrés del RE en la célula β . Por ejemplo, la inhibición del factor de transcripción HNF1A sensibiliza a las células β a la apoptosis inducida por el estrés en el RE (Kirkpatrick *et al.*, 2011) y PDX1 controla la expresión de genes de la UPR y aumenta la resistencia de las células β al estrés del RE (Sachdeva *et al.*, 2009).

2.4.2 Ruta mTOR

En mamíferos, la vía de señalización mTOR (originalmente conocida como “TOR de mamíferos”; ahora “TOR mecanicista”) sensa los nutrientes, la energía, el estrés y factores de crecimiento, con el fin de promover el crecimiento y la división celular. La desregulación de mTOR desencadena en apoptosis, autofagia y fallos en la síntesis de proteínas en órganos importantes, incluidas las células β pancreáticas. La maquinaria mTOR es clave en la modulación de la masa de células β . La inactivación de la señalización de mTOR disminuye la masa de células β y la secreción de insulina, mientras que la glucosa en sangre aumenta, por lo tanto, provoca hiperglicemia y degenera en diabetes (Wang, Yang and Zhang, 2016).

mTOR es una quinasa serina/treonina conservada en la evolución y está formada por dos complejos distintos llamados mTOR complejo 1 (mTORC1) y 2 (mTORC2) e interactúa con varias proteínas relacionadas con crecimiento celular y metabolismo (Um, D'Alessio and Thomas, 2006; Wullschleger, Loewith and Hall, 2006).

mTORC1 juega un papel importante en la función de las células β y participa principalmente en la proliferación celular, el tamaño celular, la masa, regula la apoptosis y la autofagia (Reiling and Sabatini, 2006; Fraenkel *et al.*, 2008). mTORC2 participa en la regulación de la masa celular β , la proliferación y la secreción de insulina. La eliminación de mTORC2 en las células β causa una reducción en la actividad de Akt y la activación de *FoxO1*, lo que conduce a una hiperglucemia leve e intolerancia a la glucosa que se debe

a la reducción de la masa de las células β y a la disminución de la producción de insulina (Gu *et al.*, 2011; Le Bacquer *et al.*, 2013).

La interacción entre el estrés del RE y mTORC1 es complicada, ya que la activación de UPR puede ocurrir aguas arriba o aguas abajo de mTORC1 (Appenzeller-Herzog and Hall, 2012). Bajo condiciones patológicas de activación crónica, el estrés en el RE inhibe la vía Akt/mTORC1 y promueve la autofagia (Wang and Proud, 2006; Qin *et al.*, 2010; Nakajima *et al.*, 2011).

Existen evidencias que la vía de señalización de mTOR está desregulada en enfermedades humanas, incluida la DMT2. Se ha demostrado la importancia de la señalización de mTOR en la regulación de la sensibilidad a la insulina (Um *et al.*, 2004; Kahn, Hull and Utzschneider, 2006; Newgard *et al.*, 2009). Sin embargo, la forma en que las alteraciones de esta vía en las células β contribuyen a la patogénesis de la diabetes no se conocen en profundidad. La inactivación de mTORC1 en las células β maduras deteriora la secreción y mTORC1 regula el procesamiento de insulina a través del factor de inicio de la traducción 4E-BP2/eIF4E. En resumen, la señalización de mTORC1 en las células β controla la homeostasis de la glucosa al regular la masa de células β , la proliferación, la apoptosis y el procesamiento y secreción de insulina (Blandino-Rosano *et al.*, 2017).

2.4.3 Estrés mitocondrial

El estrés oxidativo mitocondrial ocurre debido al exceso de producción o la eliminación inadecuada de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*) (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (*reactive nitrogen species*) (RNS), excede la capacidad antioxidante de las células y pueden tener múltiples efectos nocivos sobre el metabolismo celular (Hasnain, Prins and McGuckin, 2016).

El estrés oxidativo puede inducir el mal plegamiento de las proteínas al alterar el estado redox del RE e interrumpir la formación de los enlaces disulfuro en las proteínas. Además, el mal plegamiento de las proteínas en sí mismo conduce también a la producción de ROS. Por lo tanto, este círculo deletéreo provoca la disfunción de las células β , perjudica la función de la vía secretora, provoca la apoptosis de células β e

inflamación local de los islotes (Donath *et al.*, 2013; Novials, Montane and Cadavez-Trigo, 2014).

En las células β se pueden encontrar una variedad de moléculas ROS y RNS, incluidos los radicales libres, como el óxido nítrico ($\text{NO} \cdot$), el superóxido ($\text{O}_2 \cdot^-$) y el radical hidroxilo ($\text{OH} \cdot$), moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o aniones como el superóxido (O_2^-) y el peroxinitrito (ONOO^-). ROS y RNS pueden ser productos del metabolismo mitocondrial o pueden producirse en el citoplasma, por ejemplo, por la enzima NADPH y óxido nítrico sintasa inducida (iNOS). Diferentes ROS y RNS también pueden reaccionar entre sí; por ejemplo, $\text{NO} \cdot$ y $\text{O}_2 \cdot^-$ pueden reaccionar para producir ONOO^- , que es un inductor de estrés del RE muy potente (Lenzen, 2008; Newsholme *et al.*, 2012; Keane *et al.*, 2015).

Para regular las ROS y RNS intracelulares, las células producen enzimas desintoxicantes, y el equilibrio entre la producción y la desintoxicación determina las concentraciones de ROS y RNS intracelulares.

Debido a la alta carga biosintética y al requerimiento de oxígeno de las células β , se considera que son muy sensibles a la sobreproducción de ROS y RNS. El estrés oxidativo se considera un elemento importante en la disfunción de las células β y la reducción de las células β en la DMT2 (Lenzen, 2008; Newsholme *et al.*, 2012; Keane *et al.*, 2015). Además de causar estrés en el RE, el estrés oxidativo tiene múltiples efectos nocivos sobre la función de las células β , incluida la disminución de la transcripción de insulina (Kaneto and Matsuoka, 2015). En la DMT2, el exceso de ROS activa las vías apoptóticas de las células β . El estrés oxidativo promueve el plegamiento de la proinsulina, la activación de la ERAD y la posterior degradación proteosómica de la proinsulina en las células β (Bachar-Wikstrom *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha propuesto que la producción de algunos ROS es necesaria para la señalización dentro de las células β y una función biosintética y secretora normal (Ježek, Dlasková and Plecitá-Hlavatá, 2012).

2.4.4 Interacción entre el estrés del retículo endoplásmico y mitocondrial

Como se ha mencionado anteriormente, el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE son fenómenos estrechamente relacionados e interconectados, y generalmente ocurren de forma simultánea o sucesivamente. Tienen efectos perjudiciales en la

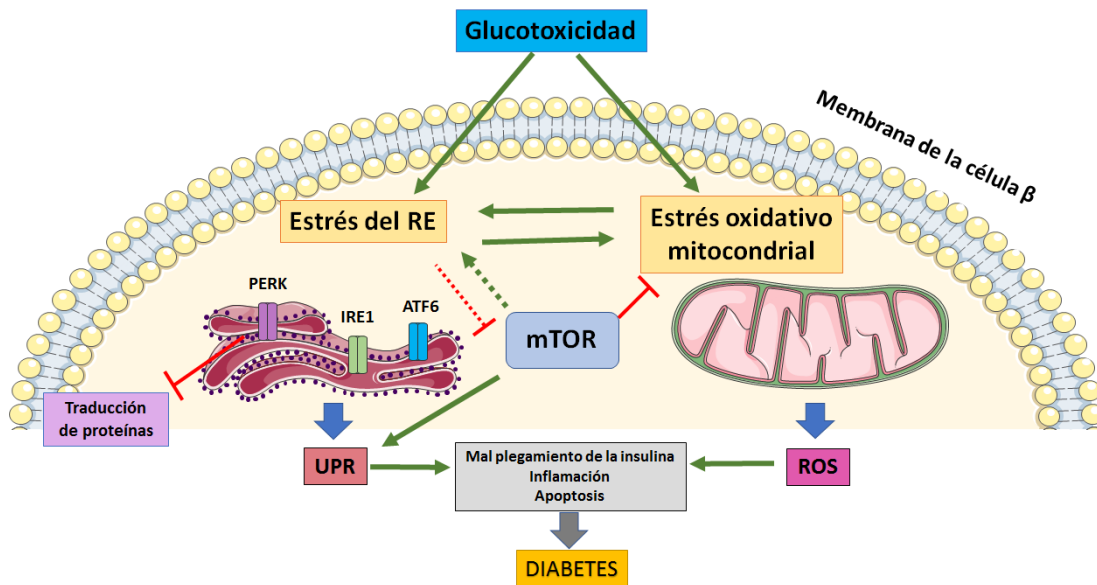


Figura 8. Conexión entre el estrés del RE, el estrés oxidativo mitocondrial y la ruta mTOR en la célula β. La glucotoxicidad induce estrés celular a través de la activación de estrés en el RE y estrés oxidativo en la mitocondria. En respuesta al estrés del RE, se activan PERK, IRE1 y ATF6. Se inhibe la traducción de proteínas con el fin de dejar de acumular proteínas mal plegadas. Por otra parte, el estrés oxidativo y el estrés del RE inducen un exceso en la producción de ROS, activa la inflamación y la apoptosis de las células β, con la consecuente aparición de la DMT2. El estrés del RE crónico inhibe la ruta Akt/mTORC1, y la ruta mTOR disminuye el estrés oxidativo de la mitocondria. Por otra parte, la activación de mTORC1 activa la UPR, mientras que en fases posteriores induce el estrés del RE. Figura creada usando plantillas de Servier Medical Art, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

biosíntesis y secreción de la insulina en la célula β, así como en la respuesta inflamatoria y la apoptosis, en particular en la DMT2 (Hasnain, Prins and McGuckin, 2016).

La conexión entre el estrés oxidativo y el estrés del RE es debido a que el mal plegamiento de proteínas resulta en la producción de ROS; del mismo modo, el estrés oxidativo perturba el estado redox del RE provocando estrés, lo que altera la formación correcta de los enlaces disulfuro y el plegamiento adecuado de las proteínas. Por lo tanto, las ROS se puede producir en el RE y las mitocondrias, y juega un papel crítico en muchos procesos celulares, provocando estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y estrés del RE (Fig. 9) (Malhotra and Kaufman, 2007).

El estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE, como una espada de doble filo, juegan papeles críticos en la pérdida de células β pancreáticas y la secreción anormal de insulina. Los complejos mTOR juegan un papel complejo en la regulación de la proliferación y apoptosis de las células β , así como en la biosíntesis y secreción de insulina, en parte a través de la mejora del estrés oxidativo o el estrés del RE. En resumen, el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE en las células β son características patológicas interconectadas en la DMT2, lo que resulta en una biosíntesis y secreción anormal de insulina y en la apoptosis de las células β (Wang, Yang and Zhang, 2016).

3. Organogénesis pancreática

Debido a la dificultad de obtener muestras pancreáticas humanas en etapas embrionarias, la comprensión del desarrollo del páncreas que tenemos proviene principalmente de estudios en ratones. Sin embargo, la morfogénesis y los reguladores clave en la organogénesis del páncreas parecen estar muy conservados entre humanos y ratones (Jennings *et al.*, 2013).

La formación del páncreas se puede separar en tres etapas. En el ratón, la transición primaria ocurre entre la etapa embrionaria (E) 8.5 y E12.5 e incluye la formación de los vestigios pancreáticos a partir del tubo intestinal primitivo endodérmico y la especificación de los diferentes tipos celulares pancreáticos (Pan and Wright, 2011). Durante la transición secundaria (E12.5-E15.5) el epitelio pancreático sufre una extensa expansión y ramificación acompañado de la diferenciación de las células acinares, ductales y endocrinas. La tercera fase de la formación del páncreas tiene lugar después de E15.5 con una mayor expansión y maduración que continúa después del nacimiento.

En el ratón, el páncreas se origina en una región discreta del tubo intestinal primitivo endodérmico que forma una evaginación dorsal y ventral (yemas) que comienza alrededor de E8.5 (Kumar and Melton, 2003; Pan and Wright, 2011). La formación de las yemas pancreáticas está regulada por señales de tejidos adyacentes, como la notocorda, el mesodermo cardíaco y el endotelio aórtico. Se han identificado algunas de las señales extrínsecas que controlan la especificación del páncreas e incluyen, entre otras, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la proteína morfogenética ósea (*bone morphogenetic protein*) (BMP), el ácido retinoico (AR) y *Hedgehog* (Hh) (Kumar *et al.*, 2003).

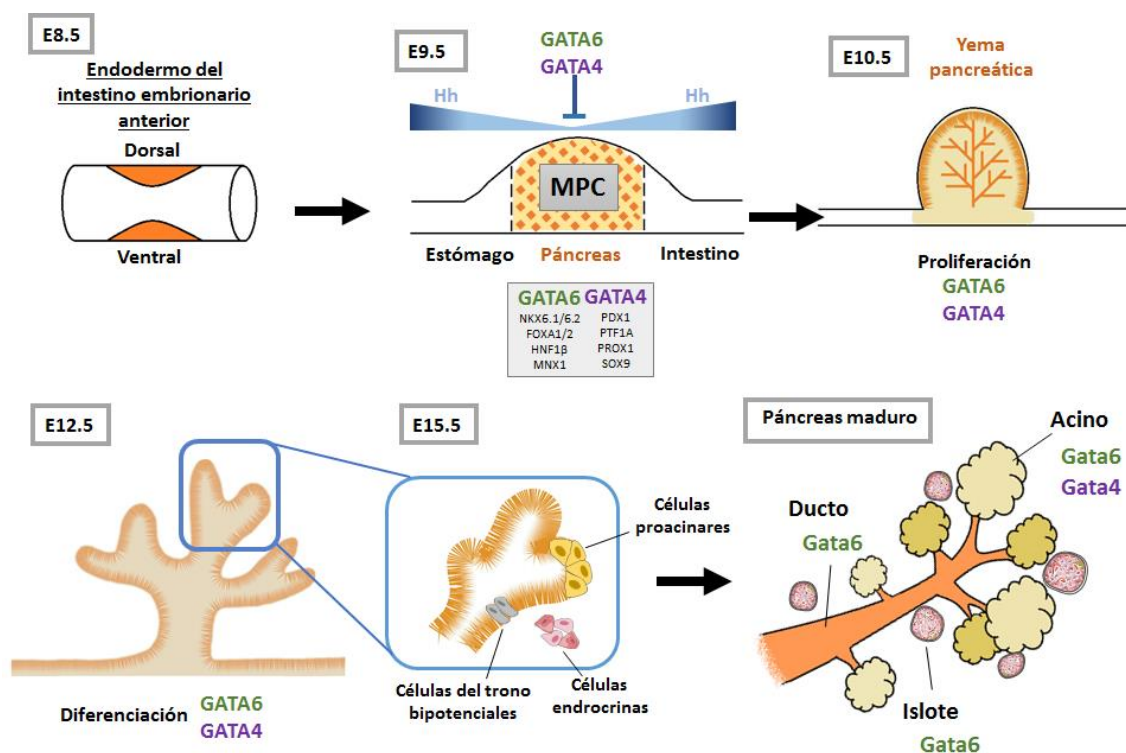


Figura 9. Descripción general del desarrollo del páncreas de ratones. La especificación del páncreas ocurre en la etapa embrionaria (E) 8.5 en regiones discretas del endodermo del tubo embrionario anterior que escapan de las señales inhibitorias de Hedgehog (Hh). El epitelio pancreático temprano está formado por células progenitoras pancreáticas multipotentes (MPC) que proliferan y se expanden por la acción de factores de transcripción específicos, incluidos GATA4 y GATA6 (E9.5-E10.5). Entre E12.5 y E15.5, el epitelio pancreático sufre un proceso de ramificación que resulta en la formación de dominios apicales (proacinar) y dominios troncales (ductal y endocrino). En el páncreas maduro, la expresión de Gata4 está restringida en gran medida a las células acinares. GATA6 se expresa en los islotes de Langerhans, en las células acinares y ductales. Esta figura fue creada usando plantillas de Servier Medical Art, bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

Curiosamente, los primordios pancreáticos dorsal y ventral son inducidos por señales diferentes. A diferencia de otros órganos derivados del endodermo, la inducción del páncreas dorsal requiere la inhibición del ligando Sonic Hedgehog (*Shh*) de la ruta

Hedgehog (Hh), mediado por señales procedentes de la notocorda (Hebrok, Kim and Melton, 1998). Además, también es necesaria la señalización del ácido retinoico para el desarrollo del páncreas dorsal (Öström *et al.*, 2008). Estas señales extrínsecas activan la expresión de factores de transcripción específicamente en el endodermo prepancreático.

Entre estos factores de transcripción que participan en la especificación del páncreas, los factores PDX1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) y PTF1A (*pancreas specific transcription factor 1a*) son los primeros en expresarse en el dominio pancreático y juegan un papel fundamental en los estadios tempranos del desarrollo pancreático (Jonsson *et al.*, 1994; Offield *et al.*, 1996; Stoffers *et al.*, 1999; Beres *et al.*, 2006; Burlison *et al.*, 2008). Una vez que se forman el páncreas dorsal y ventral, el epitelio pancreático experimenta una expansión desde E9.5 hasta E12.5, cuando las dos yemas se fusionan.

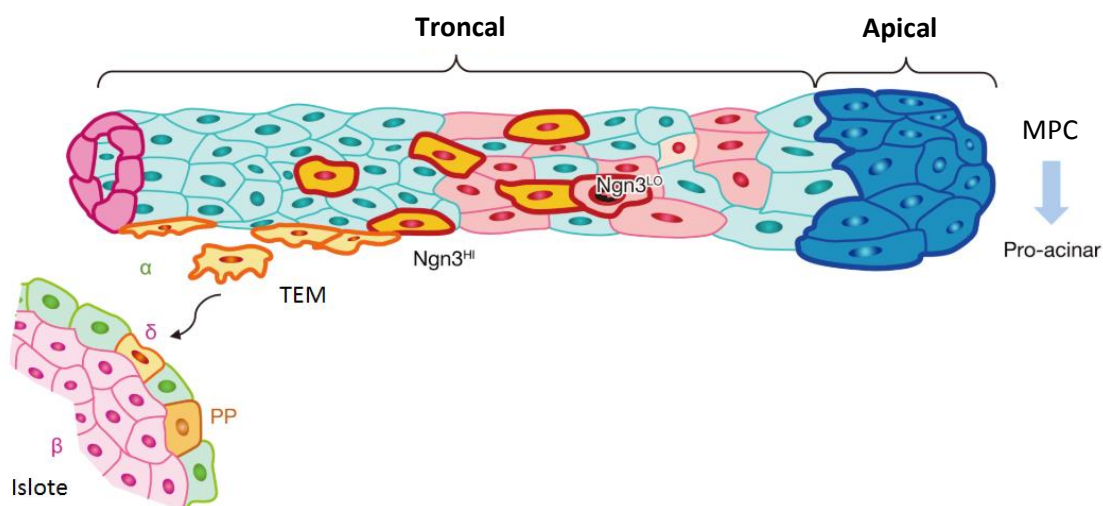


Figura 10. Modelo de organización de los dominios apical y del tronco en la transición secundaria. Alrededor de E12 la región apical está formada por células progenitoras indiferenciadas (células pancreáticas multipotentes; CPM). Las células apicales, de color azul oscuro, darán lugar a las células acinares (pro-acinares). Los precursores endocrinos positivos para Ngn3 (Ngn3HI), de color amarillo, se delaminan del tronco, posiblemente a través de una transición epitelio-mesénquima (TEM), y dan origen a los diferentes tipos celulares endocrinos, agrupándose para formar los islotes de Langerhans. En color azul claro se representan los progenitores bipotenciales de células endocrinas y ductales. En color rosa claro, se representan las células ductales diferenciadas. Imagen modificada de Fujitani, 2017.

Durante este periodo, también se establece la vascularización y la innervación del páncreas (Munoz-Bravo *et al.*, 2013).

El epitelio pancreático temprano está formado por células progenitoras multipotentes (*multipotent progenitor cells*) (MPC) que darán lugar a los diferentes tipos de células pancreáticas. La expansión de las MPC está mediada por señales extrínsecas como la señalización Wnt y FGF. Además, varios factores de transcripción intrínsecos están involucrados en la expansión y mantenimiento de los MPC, incluidos PDX1, PTF1A, SOX9, FOXA1, FOXA2, GATA4, GATA6, HES1, HNF1B, HNF6, entre otros (véase más abajo) (Fig. 9) (Shih, Wang and Sander, 2013; Cano *et al.*, 2014; Bastidas-ponce *et al.*, 2017; Larsen and Grapin-Botton, 2017). Existe una extensa regulación cruzada entre estos factores de transcripción que generan una red reguladora de genes que mantiene la multipotencia de estos progenitores pancreáticos. Estudios recientes han visto que esta misma red reguladora de genes controla la expansión de las MPC humanas (Cebola *et al.*, 2015).

Entre E12.5 y E15.5 en el ratón, en el período conocido como la transición secundaria, tiene lugar un proceso complejo de morfogénesis de ramificación del epitelio pancreático que da como resultado la formación de dos dominios: el extremo apical o “*tip*” y el troncal o “*trunk*”, que definirán los diferentes destinos de las células pancreáticas (Zhou *et al.*, 2007). Así, las células que se sitúan en la zona apical se diferenciarán hacia las células acinares, mientras que las células situadas en el tronco darán lugar a las células endocrinas y las ductales (Fig. 9 y 10). La segregación de los linajes pancreáticos está mediada por la represión cruzada transcripcional entre *Ptf1a* (que promueve la identidad de las células apicales) y *Nkx6.1/6.2* (que promueve la identidad de las células del tronco) (Schaffer *et al.*, 2010). Durante la transición secundaria, el regulador maestro de la diferenciación endocrina, el factor de transcripción Neurogenina 3 (NGN3) se activa en células individuales del tronco. Estas células que expresan *Ngn3* se diferencian en el linaje endocrino pancreático que formarán proto-islotos (Gu, Dubauskaite and Melton, 2002).

Las células en el dominio troncal que no expresan *Ngn3* darán lugar a las células ductales adultas. La diferenciación de las células acinares apicales está regulada de manera coordinada por los factores de transcripción PTF1A, RBP-JL y NR5A2 (Beres *et al.*, 2006; Decker *et al.*, 2006; Holmstrom *et al.*, 2011).

Las células de las dos yemas pancreáticas proliferan y es a E12.5 aproximadamente, cuando ambas yemas se fusionan para formar un solo órgano conectado al tracto digestivo a través del conducto biliar común. El páncreas ventral se asocia con el asa duodenal, mientras que el páncreas dorsal crece a lo largo del lado del estómago hacia el bazo (Villasenor *et al.*, 2010; Hörnblad *et al.*, 2011). Alrededor de E15.5, hay un crecimiento sustancial del páncreas, principalmente a través de la proliferación celular acinar. Además, se produce una mayor diferenciación de las células pancreáticas endocrinas y exocrinas, un proceso que continúa tras el nacimiento.

En los últimos años, el número de factores de transcripción (FT) identificados por su participación en distintos estadios de la formación de páncreas ha crecido significativamente (Fig. 9). A continuación, se describen aquellos FT más relevantes en las cuatro etapas más distinguibles de la organogénesis pancreática: i) especificación del páncreas; ii) formación de las yemas pancreática y de la población de MPC; y iii) formación del páncreas exocrino y endocrino.

3.1 Especificación del páncreas

El dominio pancreático dentro del tubo intestinal primitivo está delimitado por la expresión superpuesta de *Pdx1* y *Ptf1a* (Kawaguchi *et al.*, 2002; Chiang and Melton, 2003). PDX1 y PTF1A son posiblemente los FT más importantes en el desarrollo pancreático y ambos desempeñan múltiples funciones en diferentes etapas de la formación del páncreas y también en el órgano adulto. *Pdx1* se expresa primero en el tubo intestinal primitivo en E8.5 delimitando así el endodermo pre-pancreático. Sin embargo, a E10.5, *Pdx1* también se expresa en el estómago posterior, el duodeno y el conducto biliar (Jonsson *et al.*, 1994; Guz *et al.*, 1995; Offield *et al.*, 1996). Antes del nacimiento la expresión de *Pdx1* en el páncreas se restringe a las células endocrinas donde permanece expresándose específicamente en las células β (Guz *et al.*, 1995; Offield *et al.*, 1996; Stoffers *et al.*, 1999).

Ptf1a se expresa por primera vez en el epitelio pancreático a E9.5. A E13.5, su expresión se restringe a las células precursoras acinares. Curiosamente, aunque *Pdx1* y *Ptf1a* se expresan temprano en el endodermo pre-pancreático y desempeñan papeles críticos en

su desarrollo, su función no es crítica para la especificación del páncreas. La inactivación individual de *Pdx1* o de *Ptf1a* o incluso la inactivación de ambos a la vez, provocan agenesia pancreática, sin embargo, el remanente de un ducto pancreático principal se observa en estos mutantes (Ahlgren, Jonsson and Edlund, 1996; Offield *et al.*, 1996; Kawaguchi *et al.*, 2002).

Debido a la importancia del papel que juega PDX1 en el desarrollo del páncreas se han estudiado en profundidad los mecanismos de los FT que controlan su expresión durante las primeras etapas de la especificación del páncreas. Se han identificado varias regiones reguladoras conservadas en la región 5' del promotor de *Pdx1*, denominadas áreas I, II, III y IV (Gerrish, Van Velkinburgh and Stein, 2004). Las áreas I-III dirigen la expresión de *Pdx1* en el páncreas temprano (Gannon, Gamer and Wright, 2001; Wiebe *et al.*, 2007), las áreas I y II regulan la expresión endocrina, y el área III regula la expresión específica de las células β (Fig.11) (Gannon, Herrera and Wright, 2000). HNF6 y FOXA2 son reguladores directos de la expresión de *Pdx1* mediante la unión a las áreas I-III, pero estos FT no parecen ser necesarios para la formación temprana de páncreas (Jacquemin, Lemaigre and Rousseau, 2003; Lee *et al.*, 2005).

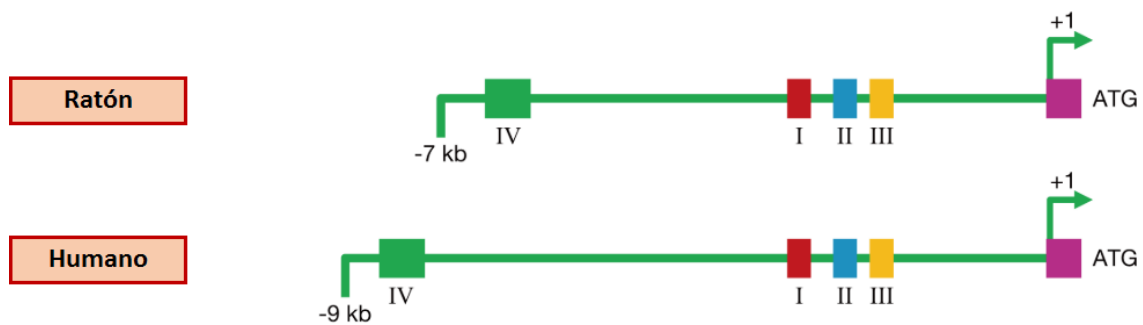


Figura 11. Diagrama de las regiones reguladoras o *enhancers* en la región 5' del promotor del gen *Pdx1*. Identificadas como áreas I, II, III y IV, conservadas en ratón y humano. Imagen modificada de Fujitani, 2017.

3.2 Formación de las yemas pancreáticas y de la población MPCs

La lista de FT críticos para la formación de las MPC ha crecido considerablemente en los últimos años. Estos incluyen PDX1, PTF1A, SOX9, FOXA1/2, PROX1, MNX1, ONECUT1, HNF1 β y GATA4/6. A continuación, revisaremos brevemente la función de estos FT en la formación y mantenimiento de los MPC y las interacciones entre ellos.

PDX1

Como se ha comentado anteriormente, la inactivación de *Pdx1* en la línea germinal causa agenesia del páncreas. PDX1 es necesario para el crecimiento epitelial y la ramificación del páncreas. Otros FT expresados en las MPC, incluidos FOXA2, GATA4, HNF6 y PTF1A regulan directamente la expresión de *Pdx1* en la yema pancreática, amplificando así el circuito transcripcional que opera en los MPC (Oliver-Krasinski *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2009).

PTF1A

PTF1A es esencial para la identidad y la proliferación de los progenitores pancreáticos. Al igual que ocurre con *Pdx1*, varios FT que se expresan en las MPC regulan la expresión de *Ptf1a*, como NKX6.1, HNF6 y MNX1. También es importante tener en cuenta que *Ptf1a* mantiene su propia expresión durante el desarrollo pancreático (Masui *et al.*, 2008).

SOX9

Sox9 se expresa en el dominio *Pdx1* desde E9.5 (Lynn *et al.*, 2007; Seymour *et al.*, 2007). Experimentos de trazado de linaje han demostrado que en esta etapa las células que expresan *Sox9* dan origen a todos los tipos celulares pancreáticos (Seymour *et al.*, 2007). Durante la transición secundaria, la expresión de *Sox9* se restringe al dominio troncal. En etapas posteriores del desarrollo del páncreas, la expresión de *Sox9* se mantiene en las células ductales. La inactivación condicional de *Sox9* en el dominio *Pdx1* produce hipoplasia pancreática grave (Seymour *et al.*, 2007) debido a la disminución en la proliferación y aumento de la apoptosis de las MPC. SOX9 regula directamente la

expresión de otros FT expresados en las MPC, como HNF1B, HNF6 y FOXA2 (Lynn *et al.*, 2007).

HNF1 β

Hnf1 β se expresa en el endodermo del intestino anterior previo a la expresión de *Pdx1* (E8) (Coffinier *et al.*, 1999). Durante la transición secundaria, su expresión se restringe al dominio del tronco epitelial pancreático. En etapas posteriores, la expresión de *Hnf1 β* se observa solo en los conductos exocrinos (Maestro *et al.*, 2003; Haumaitre *et al.*, 2005). Los mutantes *Hnf1 β* tienen una yema pancreática dorsal ligeramente reducida y ausencia total de la yema ventral, un fenotipo que recuerda al observado en los mutantes *Ptf1a*.

HNF6

Hnf6 se expresa por primera vez en E8.5 en la región anterior y media del intestino anterior embrionario. Pero antes del nacimiento su expresión se limita a las células ductales y acinares (Maestro *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). Los ratones mutantes para *Hnf6* presentan hipoplasia pancreática y menor expresión de *Pdx1* (Jacquemin, Lemaigre and Rousseau, 2003). La inactivación de *Hnf6* en el dominio de expresión *Pdx1* produce defectos en la ramificación y el crecimiento del epitelio pancreático (Zhang *et al.*, 2009).

MNX1

Mnx1 se expresan en todo el endodermo intestinal primitivo a E8 (Harrison *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Y forma un gradiente dorsal-ventral en E9.5. Esta expresión de *Mnx1* desaparece del epitelio pancreático en E12.5 (Harrison *et al.*, 1999) y posteriormente se expresa en las células β maduras (Harrison *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009). Los embriones deficientes para *Mnx1* presentan agenesia del páncreas dorsal, mientras que la yema ventral se forma normalmente.

PROX1

Prox1 (*Prospero-related homeobox transcription factor1*) se expresa en el endodermo pre-pancreático. Se expresa en el dominio progenitor pancreático temprano, pero a partir de E15.5 se limita a las células ductales y endocrinas (Wang *et al.*, 2005). Los

embriones mutantes *Prox1* presentan diferenciación prematura de las células acinares y defectos en la ramificación epitelial pancreática (Verzi, 2008).

Factores FOXA

Los factores FOXA1 y FOXA2 (*forkhead box A1 and A2*) se expresan en el primordio pancreático antes de la morfogénesis del páncreas y su expresión se mantiene en todos los tipos celulares pancreáticos durante el desarrollo y la edad adulta (Lee *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008). FOXA1 y FOXA2 tienen funciones redundantes en el desarrollo temprano del páncreas. La inactivación individual de estos FT no tiene un impacto importante en la formación de páncreas. Sin embargo, la inactivación condicional de ambos en el dominio progenitor pancreático conduce a hipoplasia pancreática grave (Gao *et al.*, 2008). Estos defectos pueden deberse en parte a la pérdida de expresión de *Pdx1* en las MPC. Por lo tanto, FOXA1 y FOXA2 son dos factores de transcripción esenciales para la expresión temprana de *Pdx1*.

3.3 Formación del páncreas exocrino y endocrino

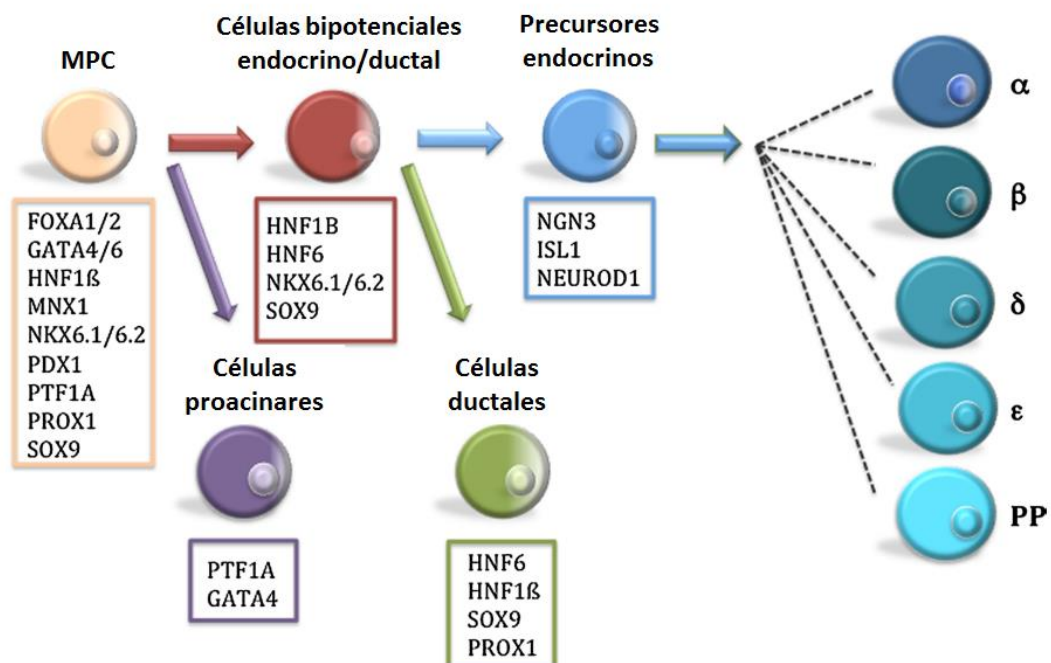


Figura 12. Factores de transcripción clave en la morfogénesis pancreática. Esquema de los diferentes tipos celulares durante el desarrollo embrionario del páncreas con indicación de los diferentes factores de transcripción claves en cada uno de los estadios. Imagen modificada de Cano *et al.*, 2014.

Como se mencionó anteriormente, entre E12.5 y E15.5, el epitelio pancreático experimenta un proceso de expansión, ramificación y diferenciación, y el epitelio se diferencia en el dominio apical y el dominio troncal, a partir de los cuales se generan células progenitoras acinares y células progenitoras ductales/endocrinas, respectivamente (Zhou *et al.*, 2007; Solar *et al.*, 2009; Kopp *et al.*, 2011). Estos dominios también están definidos por la expresión específica de ciertos FT. *Ptf1a* se expresa exclusivamente en las células apicales del epitelio pancreático, mientras que *Sox9*, *Hnf1 β* y *Nkx6.1* se expresan en las células troncales (Zhou *et al.*, 2007; Hald *et al.*, 2008; Solar *et al.*, 2009; Schaffer *et al.*, 2010; Kopp *et al.*, 2011). PTF1A y los factores NKX6 (NKX6.1 y NKX6.2) se antagonizan mutuamente para especificar un destino exocrino o ductal/endocrino (Fig. 12) (Schaffer *et al.*, 2010).

3.3.1 Diferenciación de las células acinares y ductales

PTF1A es el regulador clave de la diferenciación de las células acinares (Esni *et al.*, 2004). Curiosamente, PDX1 también parece ser necesario para la diferenciación exocrina. La inactivación de *Pdx1* a E13.5 da como resultado la formación de acinos inmaduros (Hale *et al.*, 2005). Estos resultados indican que si bien PDX1 no es necesario para la especificación de las células acinares, si es necesario para la diferenciación acinar.

Los mecanismos moleculares implicados en la especificación y desarrollo ductal no se conocen bien. En los últimos años se ha descrito un número creciente de FT que se expresan en el linaje ductal durante la formación del páncreas y en la etapa adulta, incluidos SOX9, HES1, HNF1 β , HNF6 y PROX1.

3.3.2 Diferenciación de las células endocrina

El factor de transcripción NGN3 se expresa en las células proendocrinas y es el factor inductor del programa endocrino mediante la activación directa de la expresión de los otros genes que codifican para FT necesarios para la diferenciación endocrina, incluidos NEUROD1, PAX4, INSM1, RFX6, NKX2.2 y MYT1 (Huang *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003, 2010; Watada *et al.*, 2003; Gasa *et al.*, 2004; Mellitzer *et al.*, 2006; Soyer *et al.*, 2010;

Arda, Benitez and Kim, 2013). La diferenciación celular, la supervivencia, la maduración y el desarrollo de los subtipos endocrinos requiere la acción de FT específicos para cada proceso. Así por ejemplo, RFX6 (*Regulatory X-box binding 6*) es necesario para la diferenciación de los diferentes tipos celulares endocrinos (con la excepción de las células PP) y ISL1 es necesario para la diferenciación, proliferación y supervivencia de las células endocrinas tras la transición secundaria (Du *et al.*, 2009).

En la especificación y función de los diferentes tipos celulares endocrinos participan los FT NKX, NKX2.2, NKX6.1 y NKX6.2, que se expresan tanto en los MPC como en el páncreas endocrino adulto. *Nkx6.1* juega un papel crítico en el control de la biosíntesis de insulina, la secreción de insulina y la proliferación de las células β . La inactivación condicional de *Nkx6.1* en ratones adultos causa diabetes e hipoinsulinemia (Talchai *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013). Este factor de transcripción es además un regulador de genes críticos para la función de las células β , incluidos los genes involucrados en la captación de la glucosa (*Slc2a2*), así como reguladores transcripcionales que participan en la maduración de células β (MAFA, RFX6, MNX1). NKX2.2 interactúa genéticamente con otros FT para regular la especificación de las células endocrinas. NKX2.2 regula a *NeuroD1* en las células progenitoras para especificar los diferentes linajes celulares (Mastracci *et al.*, 2013). NKX2.2 también interactúa con *Arx* (*homeobox x-linked*) importante en la formación de las células PP (Mastracci, 2008).

Otros factores transcripcionales implicados en la especificación de las células endocrinas son los factores PAX4 y ARX que presentan actividades opuestas. Tanto *Pax4* como *Arx* se expresan inicialmente en las células progenitoras que expresan *Ngn3* (Sosa-Pineda *et al.*, 1997; Collombat *et al.*, 2003), pero en estados más diferenciados, *Pax4* promueve la diferenciación de las células β y δ , mientras que *Arx* promueve la especificación de las células α . El factor PDX1 también podría regular la especificación de las células α y β . La expresión forzada de *Pdx1* en los progenitores endocrinos induce un ligero aumento en la formación de células β , acompañada de una disminución en el número de células α (Yang *et al.*, 2011).

Una vez se ha establecido el destino de las células endocrinas, se requieren la acción de FT adicionales para el mantenimiento de la función celular. Se ha descrito un número

significativo de FT involucrados en este proceso, incluidos FOXA2, GLIS3, ISL1, MAFA, MAFB, NEUROD1, PAX6, RFX3 y PDX1.

En la edad adulta, la expresión de *Pdx1* se restringe a las células β y δ de los islotes, donde mantiene la identidad y la función de las células β a través de la regulación de genes implicados en la homeostasis de la glucosa, como la insulina, *Slc2a2* y *Gkc*. La inactivación específica de *Pdx1* en las células β del ratón adulto causa hiperglucemia severa y pérdida de identidad celular, transdiferenciándose a células secretoras de la hormona glucagón (Gao *et al.*, 2014; Bastidas-Ponce *et al.*, 2017).

MAFA (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) es un factor de transcripción crítico para el desarrollo y la maduración de las células β . Del mismo modo, MAFA es un regulador positivo del gen de la insulina. Durante el desarrollo del páncreas, la expresión de *MafA* se detecta por primera vez al comienzo de la fase de diferenciación de las células productoras de insulina (Kaneto and Matsuoka, 2015; Zhu *et al.*, 2017). La maduración de la célula β por tanto requiere la acción coordinada de distintos FT que además refuerzan el circuito transcripcional regulando recíprocamente su expresión. Así, PDX1, NGN3 y MAFA también se regulan mutuamente durante el desarrollo pancreático. PDX1 regula la expresión de NGN3 y de MAFA (Oliver-Krasinski *et al.*, 2009) y a su vez, MAFA regulan la expresión de PDX1 en las células β mediante la unión a la región reguladora del Área II del gen *Pdx1* (Vanhoose *et al.*, 2008).

3.4 Diferencias en el desarrollo embrionario pancreático entre ratones y humanos

Nuestro conocimiento actual del desarrollo pancreático humano deriva principalmente de estudios histológicos y de estudios en modelos animales como el ratón. Los estudios histológicos están limitados por la dificultad para obtener tejidos humanos embrionarios de calidad, especialmente en las primeras etapas del desarrollo del páncreas. Sin embargo, la organogénesis pancreática y los FT involucrados se encuentran bastante conservados entre humanos y ratones (Polak *et al.*, 2000; Piper *et al.*, 2004; Lyttle *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2009; Jennings *et al.*, 2013).

La formación de páncreas en humanos se inicia en una etapa equivalente a la del ratón. Parece que el comienzo de la diferenciación endocrina se retrasa ligeramente en

humanos en comparación con ratones. Esto podría estar relacionado con la falta aparente de la primera ola de formación de células endocrinas que se observa en el ratón (Jennings *et al.*, 2013). Curiosamente, a pesar de este retraso en la diferenciación endocrina, la agrupación de células endocrinas en islotes ocurre antes en embriones humanos.

Otra diferencia significativa entre el desarrollo endocrino humano y de ratón es que parece que en humanos existe un único período de formación de células endocrinas a diferencia de las dos etapas que ocurre en el desarrollo endocrino murino (Capito *et al.*, 2013; Jennings *et al.*, 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, los islotes humanos y de ratón adultos son marcadamente diferentes, tanto en la arquitectura como en la composición celular (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2005; Bosco *et al.*, 2010). Esta disposición celular diferente en humanos podría tener efectos importantes en la función de los islotes (Cabrera *et al.*, 2005). Curiosamente, la arquitectura de los islotes embrionarios humanos se asemeja a la de los islotes de ratones adultos (Jeon *et al.*, 2009). Parece ser que posteriormente los islotes humanos se someten a un proceso de reorganización celular (Jeon *et al.*, 2009).

Los patrones de expresión de los FT son similares en el desarrollo del páncreas humano y del ratón (Jennings *et al.*, 2013), sin embargo, existen algunas diferencias. Por ejemplo, la expresión de *PDX1* aparece un poco más tarde en el desarrollo pancreático humano (Jennings *et al.*, 2013). Otra diferencia significativa es que *NKX2.2* no se expresa en los progenitores pancreáticos humanos antes de la formación endocrina (Jennings *et al.*, 2013). Además, la duración de la expresión de *NGN3* en el páncreas humano en desarrollo es mucho más prolongada en el tiempo (Capito *et al.*, 2013), dándose así una fase de diferenciación de las células endocrinas más extensa que en ratones. Curiosamente, el patrón de expresión de *MAFB* tampoco es completamente equivalente, ya que se detecta en células β maduras en humanos mientras que está ausente en las células β adultas de ratón (Dorrell *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2012).

Los estudios genéticos que asocian mutaciones en genes con defectos pancreáticos en el desarrollo o función del páncreas en humanos fenocopian las mutaciones en dichos genes en ratón, apoyando así la idea de programas de desarrollo pancreáticos conservados entre ambas especies (Cano *et al.*, 2014). Sin embargo, también existen algunas diferencias especialmente en la dosis alélica requerida para el desarrollo del fenotipo. Quizás los ejemplos más conocidos son algunos de los FT vinculados a MODY. Las mutaciones heterocigotas de pérdida de función en los genes *HNF1A* (MODY3), *HNF1B* (MODY5) y *HNF4A* (MODY1) causan diabetes en humanos. En ratones, este fenotipo sólo se observa en homocigosis (Horikawa *et al.*, 1997). Las posibles diferencias en el tiempo de desarrollo pancreático entre las dos especies pueden hacer que haya diferencias en la sensibilidad a la dosis alélica. Así un mayor tiempo de diferenciación endocrina en humanos puede hacerlo más sensible a la pérdida de un alelo de un gen clave en dicho proceso, mientras que, en ratones un único alelo puede ser suficiente para completar la diferenciación en un periodo más breve (Rodríguez-Seguí, Akerman and Ferrer, 2012).

4. Factores de transcripción GATA

La familia de factores de transcripción GATA está formada por seis proteínas (GATA1-6) que participan en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Los factores GATA se nombraron así por la secuencia consenso de ADN a la que se unen (A/T) GATA (A/G), que es reconocida por los dominios tipo dedo de zinc comunes a todos los miembros de la familia GATA. De los dos dedos de zinc de la proteína, uno de ellos es necesario para el reconocimiento y la unión a su sitio consenso (Yang and Evans, 1992). El otro dedo de zinc también sirve de unión a la secuencia de reconocimiento GATA y estabiliza la interacción con ciertas secuencias o también participa de la interacción con otros cofactores (Martin and Orkin, 1990; Tsang *et al.*, 1997; Trainor *et al.*, 2000; Crispino *et al.*, 2001; Bates *et al.*, 2008; Wilkinson-White *et al.*, 2015). La región de dedos de zinc se encuentra conservada un 70% entre todas los factores GATA, sin embargo las regiones terminales amino y carboxilo, que contienen módulos de activación de la transcripción, divergen considerablemente entre los factores GATA (Fig. 13) (Morrisey *et al.*, 1997).

Los factores de transcripción GATA están conservados evolutivamente entre animales, plantas y hongos (He, Cheng and Zhou, 2007).

Los vertebrados poseen seis parálogos, clasificados en dos subfamilias según sus patrones de expresión espacial y temporal. Aunque originalmente se dividieron en factores hematopoyéticos (GATA1/2/3) y cardíacos (GATA4/5/6), sus patrones de función y expresión se extienden mucho más allá de estos tejidos. Por ejemplo, GATA2 y GATA3 también tienen funciones importantes en el riñón, la piel, la próstata, las glándulas mamarias y el sistema nervioso central (Lee *et al.*, 1991; Nardelli *et al.*, 1999; Kaufman *et al.*, 2003; Grote *et al.*, 2008; Kouros-Mehr *et al.*, 2008). Del mismo modo, GATA4/5/6 son esenciales en el pulmón, el hígado y el páncreas (Molkentin, 2002), y en células troncales hematopoyéticas también se ha detectado la expresión del factor de transcripción GATA4, aunque estudios funcionales han mostrado que GATA4 no es

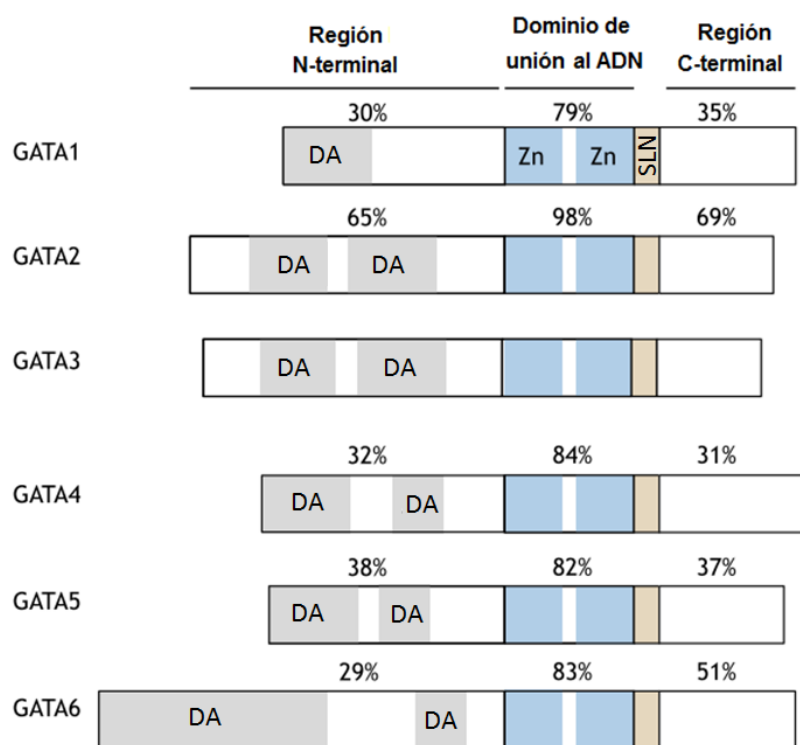


Figura 13. Familia de factores de transcripción tipo dedo de zinc GATA. Los seis miembros de la familia de factores de transcripción GATA se agrupan en GATA1/2/3 y GATA4/5/6 basándose en su expresión y similitud. Contienen dos dominios tipo dedo de zinc (Zn) altamente conservados en la evolución, la región de señal de localización nuclear (SLN) y las regiones N-terminal y C-terminal menos conservadas, las cuales contienen los dominios de activación transcripcional (DA). El porcentaje de similitud de las secuencias de las proteínas de ratón se han calculado con respecto a GATA3 como referencia. Imagen modificada de Tremblay, et al. 2018.

necesario para su posterior diferenciación a los distintos linajes hematopoyéticos (Cañete *et al.*, 2017).

Desde su descubrimiento a principios de la década de 1990, numerosos trabajos han mostrado la importancia de los factores de transcripción GATA en el desarrollo embrionario, y su estudio ha contribuido significativamente a nuestra comprensión de los principios básicos de la generación de diferentes tejidos y de su morfogénesis. La importancia de estos factores en el desarrollo embrionario viene ilustrada por la investigación en ratones donde las mutaciones inactivadoras en la mayoría de los genes GATA conducen a la letalidad embrionaria (Tremblay, Sanchez-Ferras and Bouchard, 2018). Así, la inactivación de *Gata4* en el ratón conduce a la letalidad embrionaria entre E8.5 y E10.5 debido a defectos graves en el desarrollo del cuerpo ventral y la falta de cavidad pericárdica y tubo cardíaco (Kuo *et al.*, 1997; Molkentin *et al.*, 1997). De forma similar, los ratones nulos para *Gata6* mueren antes de E7.5 debido principalmente a defectos en el endodermo extraembrionario (Morrissey *et al.*, 1998; Koutsourakis *et al.*, 1999). Y los ratones nulos para GATA 1/2/3 mueren durante el desarrollo embrionario debido a anomalías hematológicas, lo que indica un papel fundamental de estos factores de transcripción en el desarrollo hematopoyético (Simon, 1995).

Recientemente, nuevas tecnologías como Cre/*LoxP* han permitido realizar estudios de inactivación condicional en ratones, esenciales para entender las diversas funciones de los factores GATA en distintos tejidos.

Los requerimientos funcionales de los factores GATA en humanos se ven reflejados por la identificación de mutaciones genéticas en GATA asociadas con enfermedades humanas, como la anemia diseritropoyética y la trombocitopenia (mutación *GATA1*); hipoparatiroidismo, sordera y displasia renal (mutación en *GATA3*); y defectos cardíacos congénitos (mutación en *GATA4*, *GATA6* o *GATA5*) (Esch *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2003; Bonnefond *et al.*, 2012; Catli *et al.*, 2013; Eifes *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2015).

4.1 Expresión y función de los factores GATA en la organogénesis pancreática

En los últimos años, se ha descrito el papel de los factores GATA en el desarrollo de múltiples órganos derivados del endodermo. La subfamilia de factores GATA GATA4/5/6 se expresa en el endodermo definitivo que da lugar al páncreas, así como en otros órganos del sistema gastrointestinal.

En el páncreas, los estudios de la expresión de los genes *Gata4* y *Gata6* ha sido objeto de controversia durante un tiempo, probablemente por las limitaciones en las técnicas y anticuerpos usadas para la detección de estos factores (Ketola *et al.*, 2003; Nemer and Nemer, 2003; Ritz-Laser *et al.*, 2004; Decker *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios más recientes mediante inmunohistoquímica han aclarado sus patrones de expresión en el páncreas. La expresión de *Gata4* se restringe al compartimento acinar, mientras que *Gata6* se expresa tanto en el compartimento endocrino como exocrino en el páncreas adulto (Fig. 9) (Martinelli *et al.*, 2013; Sartori *et al.*, 2014; Villamayor *et al.*, 2018). Los ensayos en ratones transgénicos con genes reporteros han demostrado que los patrones de expresión de *Gata4* y *Gata6* en el páncreas son similares a lo ya observado mediante inmunohistoquímica (Rojas *et al.*, 2009; Freyer *et al.*, 2015). Sin embargo, un estudio ha detectado niveles (aunque bajos) de expresión de *Gata4* en islotes de ratón mediante técnicas de PCR cuantitativa (Sartori *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, la inactivación en la línea germinal de *Gata4* o de *Gata6* produce letalidad embrionaria (Kuo *et al.*, 1997; Molkenstein *et al.*, 1997). El uso de la complementación tetraploide ha permitido generar embriones *Gata4* $-/-$ o *Gata6* $-/-$ con células del endodermo extraembrionario *Gata4* $+/+$ o *Gata6* $+/+$, respectivamente. Estos embriones, aunque también son letales, mueren a estadios más tardíos permitiendo así estudiar el papel de GATA4 en la especificación de órganos como el hígado o el páncreas. Estos estudios mostraron que la formación del páncreas ventral y del hígado era inhibida en ausencia de GATA4 (Watt *et al.*, 2007). Sin embargo, a partir de estos estudios no queda claro si estos factores GATA juega un papel autónomo en el desarrollo del páncreas o del hígado. Más recientemente, el uso de la tecnología

Cre/LoxP ha ayudado a definir los múltiples roles de los factores GATA en el desarrollo de distintos órganos.

Los factores GATA actúan como factores iniciadores en la expresión génica específica de varios órganos durante el desarrollo embrionario (Bossard and Zaret, 1998). Como se ha comentado anteriormente, tanto *Gata4* como *Gata6* se expresan en el endodermo del intestino anterior embrionario y están involucrados en la activación de genes específicos del hígado y del intestino, respectivamente (Beuling *et al.*, 2008; Zaret *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2017). Sin embargo, la inactivación condicional y simultánea de *Gata4* y *Gata6* en el endodermo prepancreático utilizando la línea *Foxa3-Cre* no bloqueó la especificación ni la formación de las yemas pancreáticas (Xuan *et al.*, 2012). Por lo tanto, los factores GATA4 y GATA6 no parecen ser necesarios para la especificación del páncreas en ratones.

Curiosamente, se ha identificado que el factor de transcripción GATA5 está involucrado en la especificación del páncreas en el pez cebra y en *Xenopus* (Weber *et al.*, 2000; Reiter, Kikuchi and Stainier, 2001). Sin embargo, *Gata5* no parece expresarse en el páncreas embrionario de ratón. Por lo tanto, es poco probable que se requiera GATA5 para la formación de páncreas en ratones. De acuerdo con esto, no se han descrito anomalías en el páncreas en pacientes con cardiopatía congénita asociada con mutaciones en *GATA5* (Jiang *et al.*, 2013).

Estudios previos usando ratones mutantes condicionales para *Gata4* y *Gata6* en los progenitores pancreáticos usando la línea *Pdx1-Cre*, mostró que ambos factores son esenciales para la expansión y el mantenimiento de las MPC durante el desarrollo temprano del páncreas de ratón (Weber *et al.*, 2000; Reiter, Kikuchi and Stainier, 2001; Carrasco *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013). En ratones, GATA4 y GATA6 son funcionalmente redundantes en estas etapas tempranas del desarrollo pancreático. La inactivación condicional individual de *Gata4* o *Gata6* en los progenitores pancreáticos no causa aparentes defectos pancreáticos. Sin embargo, la inactivación simultánea de ambos genes causa agenesia pancreática o hipoplasia pancreática severa. La yema pancreática de los embriones mutantes dobles *Gata4/Gata6* se forma, pero no se expande, exhibiendo defectos en la ramificación epitelial, así como defectos en la proliferación de las MPC. Además, la diferenciación de las células pro-acinares y pro-

endocrinas también está bloqueada (Weber *et al.*, 2000; Reiter, Kikuchi and Stainier, 2001; Carrasco *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013).

Como se ha comentado anteriormente, la activación y mantenimiento del desarrollo pancreático en las MPC se logra mediante una regulación compleja por una variedad de factores de transcripción. Muchos de estos factores de transcripción se regulan directamente entre sí. Los factores GATA regulan la expresión de *Pdx1* durante la formación temprana del páncreas (Weber *et al.*, 2000; Reiter, Kikuchi and Stainier, 2001; Carrasco *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013). Por lo tanto, algunos de los defectos pancreáticos observados en los embriones mutantes *Gata4/Gata6* podrían deberse a una disminución de la expresión de *Pdx1*.

Curiosamente, aunque los factores GATA no son necesarios para la especificación del páncreas en el endodermo del intestino anterior, sí son necesarios para mantener la identidad pancreática en las MPC. La ausencia tanto de GATA4 como de GATA6 resultada en la conversión del páncreas dorsal y ventral a células intestinales y gástricas, respectivamente (Xuan and Sussel, 2016). Este fenotipo es causado, al menos en parte, por la activación de la vía *Shh* en los progenitores pancreáticos.

GATA6 también juega un papel en la diferenciación de las células acinares en ratón (Martinelli *et al.*, 2013). Como ya se ha comentado, los ratones deficientes en *Gata6* nacen y alcanzan la edad adulta sin defectos pancreáticos aparentes. Sin embargo, los genes importantes para la función celular acinar, incluidos los factores de transcripción y las enzimas digestivas, están regulados negativamente en el tejido pancreático nulo para *Gata6*. Es importante destacar que GATA6 regula directamente la expresión de genes clave que codifican factores de transcripción con función en el tejido acinar como *Mist1* y *Rbpjl* (Martinelli *et al.*, 2013). Estos resultados indican que GATA6 es necesario para la diferenciación acinar completa. Curiosamente, la pérdida de actividad GATA6 también se ha relacionado con la dediferenciación de las células acinares y la tumorigénesis en un modelo de ratón de adenocarcinoma ductal pancreático impulsado por *Kras* (el tipo más común de cáncer pancreático), así como en el adenocarcinoma ductal pancreático humano (Hermann *et al.*, 2014; Martinelli *et al.*, 2016, 2017). De hecho, se ha propuesto que GATA6 actúa como un supresor tumoral en el páncreas al

mantener la diferenciación de las células acinares y regular las vías inflamatorias y relacionadas con el cáncer (Bailey *et al.*, 2016).

4.2 Anomalías pancreáticas en humanos asociadas a mutaciones en los factores GATA

Hace más de una década que se identificaron por primera vez mutaciones en los genes *GATA4* o *GATA6* asociadas a defectos cardíacos, y desde entonces numerosos estudios en humanos han descrito nuevas mutaciones en estos genes como causantes de malformaciones en el corazón (Kuo *et al.*, 1997; Molkentin *et al.*, 1997; Koutsourakis *et al.*, 1999; Crispino *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2003). Sin embargo, en estos estudios sorprende que dado el amplio patrón de expresión de *GATA4* y *GATA6* en otros tejidos, ninguna otra anomalía en otro órgano no cardíaco fuese reportado en esos pacientes. En estudios más recientes por primera vez se describe mutaciones en los genes *GATA6* y *GATA4* que están asociados a defectos pancreáticos (Bonnetfond *et al.*, 2012; Yorifuji *et al.*, 2012; Catli *et al.*, 2013; De Franco *et al.*, 2013; Eifes *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2013; Shaw-Smith *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2015; Yau *et al.*, 2017). Lango Allen y colaboradores realizaron una secuenciación masiva del exoma de pacientes que nacieron sin páncreas o con una hipoplasia pancreática severa, para identificar las mutaciones genéticas que causan dicho fenotipo. La agenesia pancreática es una anomalía congénita rara en la que el páncreas se encuentra ausente o extremadamente reducido. Los pacientes desarrollan diabetes neonatal permanente (DMNP) y requieren tratamiento con insulina. También padecen insuficiencia pancreática exocrina y requieren terapia de reemplazo enzimático (Allen *et al.*, 2012; Lorberbaum and Sussel, 2017). Sólo mutaciones en el gen *PDX1* o en el gen *PTF1A* habían sido previamente asociados a agenesia pancreática en unas cuantas familias (Stoffers *et al.*, 1997; Sellick *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2009). La secuenciación del exoma reveló que de 27 individuos solo uno tenía una mutación homocigota en *PTF1A*, y ninguno de los individuos de la cohorte tenía mutaciones en *PDX1*. Sin embargo, 15 de los 27 pacientes tenían mutaciones *de novo* de pérdida de función en el gen que codifica el factor de transcripción *GATA6*, indicando que las mutaciones en *GATA6* son la causa de mayor prevalencia de agenesia pancreática en humanos. Curiosamente, estas mutaciones *de*

novo se encontraron en heterocigosis, destacando el importante papel de GATA6 en el desarrollo del páncreas humano.

Estudios posteriores han identificado nuevas mutaciones en *GATA6* asociadas a defectos en el desarrollo del páncreas (Bonnetfond *et al.*, 2012; Yorifuji *et al.*, 2012; Catli *et al.*, 2013; De Franco *et al.*, 2013; Eifes *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2015; Stanescu *et al.*, 2015; Tiyafoonchai *et al.*, 2017; Yau *et al.*, 2017). Un estudio de secuenciación de exomas en una cohorte de pacientes con agenesia pancreática aún mayor que la realizada en el estudio previo, confirmó la alta prevalencia de este fenotipo asociado a mutaciones en *GATA6* (De Franco *et al.*, 2013). Estos pacientes también presentaban algunas anomalías en otros órganos como el corazón, la vesícula biliar o presentaban hernia. Sorprendentemente, cuatro pacientes que portaban mutaciones en heterocigosis en *GATA6* no presentaron defectos en la formación del páncreas, pero sin embargo desarrollaron diabetes en etapas adultas con o sin insuficiencia exocrina. Por tanto, las mutaciones en *GATA6* en humanos producen un amplio espectro de fenotipos que van desde la agenesia pancreática a la diabetes con o sin insuficiencia exocrina. Más aún, diferentes miembros de la familia que albergan el mismo alelo mutante de *GATA6* presentaban diferentes fenotipos, desde agenesia pancreática a diabetes o incluso no presentar ningún fenotipo pancreático (Bonnetfond *et al.*, 2012; Yorifuji *et al.*, 2012; Yau *et al.*, 2017). Por tanto, otras diferencias genéticas entre estos individuos pueden ser responsables de las variaciones en sus manifestaciones fenotípicas.

4.3 Expresión y función de los factores GATA en el páncreas humano: estudio in vitro de diferenciación de células madre pluripotentes humanas a células β pancreáticas

Aunque los estudios sobre la expresión de los factores GATA durante la formación del páncreas en humanos son limitados, los patrones de expresión parecen muy similares a los observados en el desarrollo del ratón. GATA4 se observa por primera vez en el endodermo intestinal específico de páncreas en la etapa Carnegie (CS) 12 del desarrollo embrionario humano (alrededor de E9 del desarrollo del ratón) y continúa expresándose en las células progenitoras pancreáticas (Jennings *et al.*, 2013). Alrededor

de CS19 (E14.5-E15 en ratón) la expresión de *GATA4* se vuelve más localizada en las células apicales del árbol pancreático en expansión y luego se limita al linaje celular acinar. Se conoce que *GATA6* se expresa en el dominio progenitor pancreático temprano (CS16-CS18) (Cebola *et al.*, 2015), pero se tiene poca información acerca de su expresión en otras etapas embrionarias. Los datos transcriptómicos indican que *GATA6* se expresa en las células de los islotes pancreáticos humanos adultos (Cnop *et al.*, 2014; Hermann *et al.*, 2014; Bailey *et al.*, 2016; Martinelli *et al.*, 2016, 2017; Teo *et al.*, 2018).

El reciente desarrollo de protocolos para la diferenciación de células madre embrionarias humanas (*human embryonic stem cells*) (hESC) y células madre pluripotentes (*human pluripotent stem cells*) (hPSC) hacia células β constituye un modelo *in vitro* útil para el estudio de la formación pancreática humana (D'Amour *et al.*, 2006; Pagliuca *et al.*, 2014; Rezania *et al.*, 2014; Russ *et al.*, 2015). Tres estudios muy

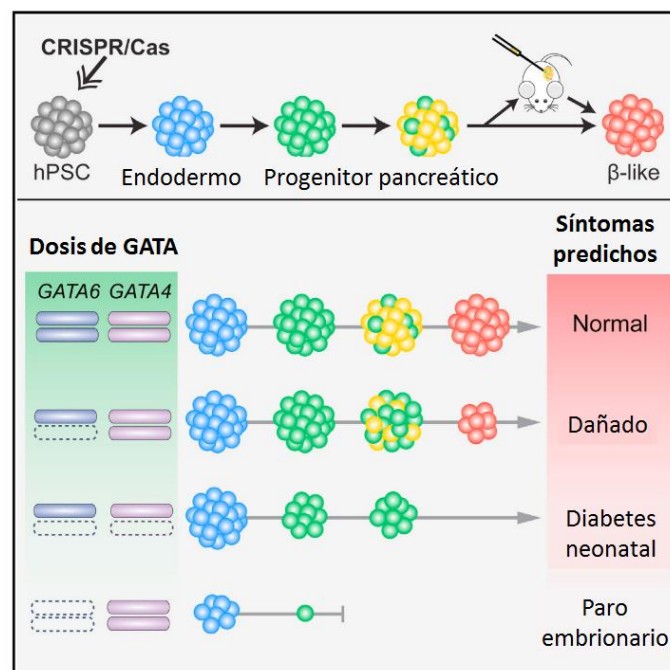


Figura 14. Estudio de la función de GATA4 y GATA6 en el desarrollo del páncreas humano. Los efectos de GATA6 en la diferenciación del páncreas humano se evaluaron inactivando *GATA6* a través de la tecnología CRISPR/Cas9 y realizando diferenciación dirigida *in vitro* hasta células β . La inactivación de *GATA6* solo tiene un efecto moderado sobre la formación de las células progenitoras pancreáticas durante la diferenciación *in vitro*. Sin embargo, se demostró que la formación de progenitores pancreáticos es altamente sensible a la dosificación de *GATA4* y *GATA6*. Imagen modificada de Shi *et al.*, 2017.

recientes han utilizado la diferenciación de células madre pluripotentes humanas (hPSC) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) para estudiar la influencia de las mutaciones de GATA6 en la diferenciación del páncreas humano *in vitro*.

Shi y colaboradores crearon líneas humanas pluripotentes (hPSC) que portan mutaciones en GATA6 asociadas a enfermedades pancreáticas, utilizando la técnica de edición génica CRISPR/Cas9 (Shi *et al.*, 2017). En un estudio complementario, Tiyafoonchai y colaboradores generaron células inducidas pluripotentes (iPSCs) a partir de un paciente con agenesia pancreática portadora de una mutación heterocigota inactivadora de GATA6 (Tiyafoonchai *et al.*, 2017). Estas células deficientes en GATA6 fueron sometidas a protocolos de diferenciación *in vitro* previamente establecidos. Estos trabajos independientes mostraron una eficiencia muy baja en la inducción del

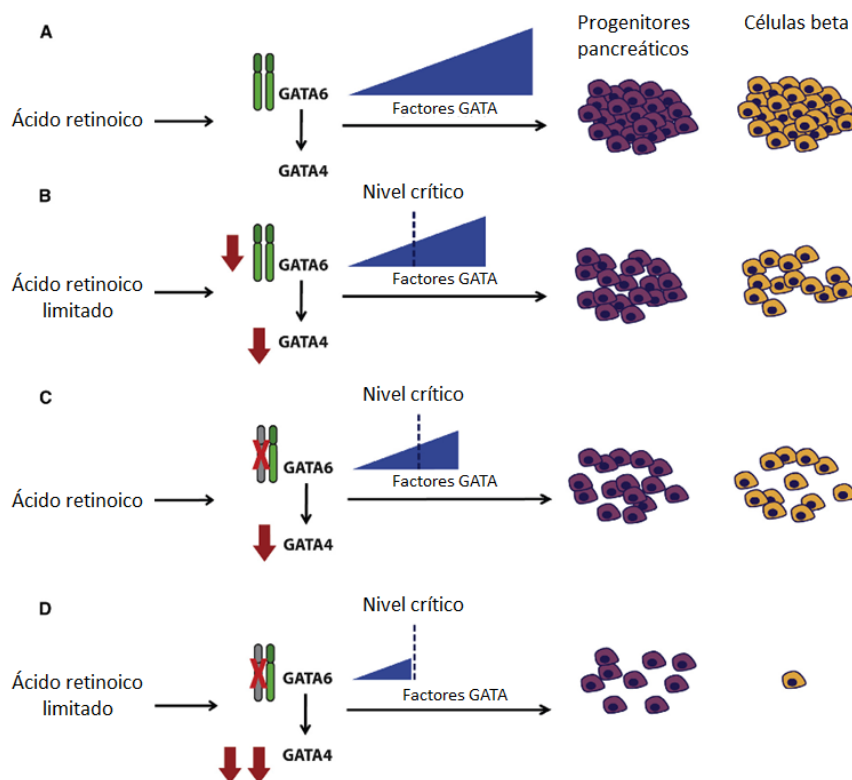


Figura 15. Papel del factor GATA6 en la inducción del endodermo definitivo humano y en la generación de células β . La reducción de los niveles de ácido retinoico durante la diferenciación pancreática en la línea de hPSC mutantes para GATA6 conduce a una disminución en la expresión de GATA4, contribuyendo a los defectos pancreáticos causados por la inactivación de GATA6, como la disminución de progenitores pancreáticos, y en último término de células β . Imagen modificada de Tiyafoonchai, et al. 2017.

endodermo definitivo, la generación de progenitores pancreáticos y la diferenciación de las células β productoras de insulina.

Estos estudios también revelaron una redundancia funcional entre los factores GATA4 y GATA6, mostrando que la formación de progenitores pancreáticos a partir de células multipotentes humanas modificadas para GATA4 y GATA6 tiene un efecto negativo mayor que las células deficientes únicamente en GATA6 (Fig. 14 y 15). Por tanto, en humanos también parece que exista una sensibilidad a la dosis alélica de GATA4 y de GATA6 en los estadios tempranos del desarrollo pancreático como había sido descrito previamente en los estudios con ratones doble mutantes *Gata4/Gata6* (Carrasco *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012). Como se comentó anteriormente, la diversidad en el fenotipo pancreático observado entre pacientes que llevan la misma mutación en GATA6, hace pensar que otros factores puedan determinar el tipo de manifestación clínica. De acuerdo con esta hipótesis, Tiyaboonchai *et al.*, 2017 mostró que la reducción de los niveles de ácido retinoico durante los protocolos de diferenciación pancreática en las líneas de hPSC mutantes para GATA6 conduce a fenotipos más severos. Sorprendentemente, la reducción del ácido retinoico también causa una disminución en la expresión de GATA4 que podría exacerbar los defectos pancreáticos causados por la inactivación de GATA6 (Fig. 15).

La diferenciación *in vitro* de hPSC también ha permitido evaluar el efecto de la inactivación de GATA6 en el desarrollo de las células β . En los estudios mencionados sobre la diferenciación *in vitro* de células pluripotentes humanas deficientes en GATA6, la eficiencia en la generación de células β fue muy baja (Shi *et al.*, 2017; Tiyaboonchai *et al.*, 2017; Chia *et al.*, 2019). Los análisis de expresión de las células β generadas mostraron una disminución en la expresión de genes importantes para la función de las células β incluyendo la expresión del gen de la insulina y otros genes que codifican para factores implicados en la secreción de insulina.

En uno de los estudios los ensayos funcionales de las células β generadas mostró que éstas presentaban defectos en la secreción estimulada por glucosa (Tiyaboonchai *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que además de en el desarrollo del páncreas, GATA6

juega un papel potencial en la formación y función de las células β adulta en humanos. Este hallazgo podría ayudar a explicar por qué ciertos pacientes con mutaciones heterocigotas de *GATA6* desarrollan diabetes en etapas adultas.

PARTE B

5. Arquitectura y función del estómago en mamíferos

El estómago es un órgano digestivo del sistema gastrointestinal presente en todos los vertebrados con mandíbula que requieren almacenamiento de alimentos o digestión preliminar en un ambiente ácido (Kim and Shivdasani, 2016). El estómago adulto es un órgano digestivo con estructura evolutivamente diversa que desempeña numerosas funciones importantes que incluyen: la digestión química y mecánica de los alimentos para la absorción posterior de los nutrientes en el intestino, en la defensa inmune como barrera para la entrada de patógenos, la regulación hormonal de la saciedad y la secreción de mucinas y pro-peptidasas activadas por ácidos (pepsinógenos) (Willet and Mills, 2016). La MUC5AC es una de las principales mucinas secretadas y tiene un papel citoprotector contra el ácido y las pepsinas presentes en el jugo gástrico, además protege contra los agentes exógenos como medicamentos y patógenos, y contra el daño mecánico (McGuckin *et al.*, 2011).

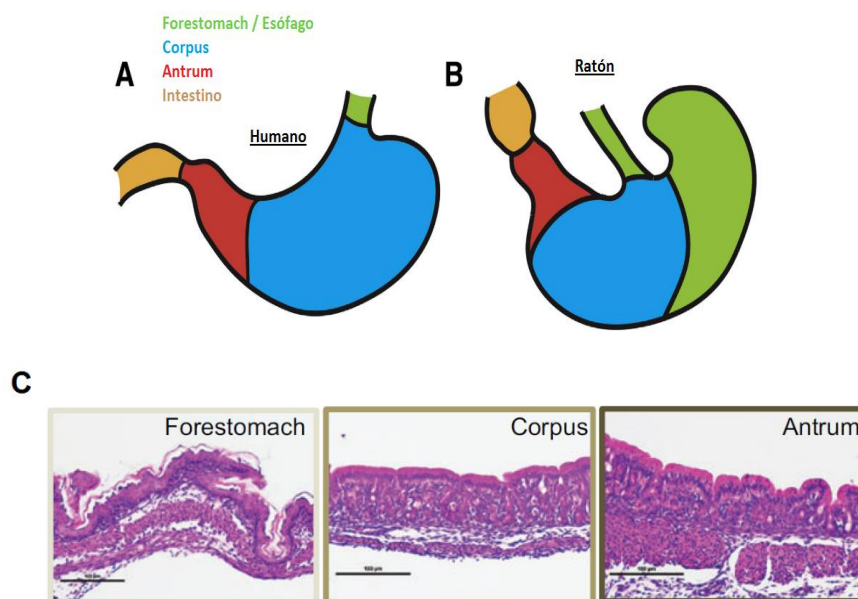


Figura 16. Arquitectura del estómago adulto. (A) El estómago en humanos se divide en dos regiones principales: el *corpus* (azul) y el *antrum* (rojo) y está completamente tapizado por un epitelio glandular, mientras que (B) en el estómago de los ratones hay un compartimento adicional llamado *forestomach* (verde) tapizado por un epitelio escamoso. (C) Tinción con hematoxilina y eosina de secciones histológicas del estómago de ratón recién nacido que ilustran el epitelio estratificado del *forestomach* y el epitelio columnar de las regiones del *corpus* y del *antrum* del epitelio glandular. Imagen A y B extraída y modificada de Willet & Mills, 2016. Imagen C extraída de Kim & Shivdasani, 2016.

El estómago está recubierto de un epitelio gástrico soportado por la lámina propia, una capa de tejido conectivo, la mucosa y una capa muscular delgada y lisa. Debajo de la mucosa se encuentra la submucosa, tejido adiposo y grandes vasos sanguíneos y linfáticos. La muscular externa es una capa gruesa de músculo liso que envuelve las capas de la mucosa y la submucosa generando las fuerzas peristálticas que mueven los contenidos a hacia el intestino. Finalmente, está recubierto por una capa adventicia o serosa (Thompson, DeLaForest and Battle, 2018).

La mucosa gastrointestinal es altamente compleja. Su morfología y función enzimática se alcanzan principalmente en la mitad de la gestación y se regenera durante toda la vida. El mantenimiento de la homeostasis de la mucosa requiere un equilibrio entre la regeneración y el recambio celular. Esta renovación se produce debido a la proliferación y diferenciación de las células madre multipotentes presentes en el epitelio. Sin embargo, poco se sabe acerca de los factores que determinan la renovación tisular (Haveri *et al.*, 2008).

Dependiendo de las necesidades y hábitos dietéticos, los vertebrados han adaptado la organización estructural e histológica del estómago (Hunt *et al.*, 2015). Los dos compartimentos principales del estómago en la mayoría de los mamíferos son: el *corpus*

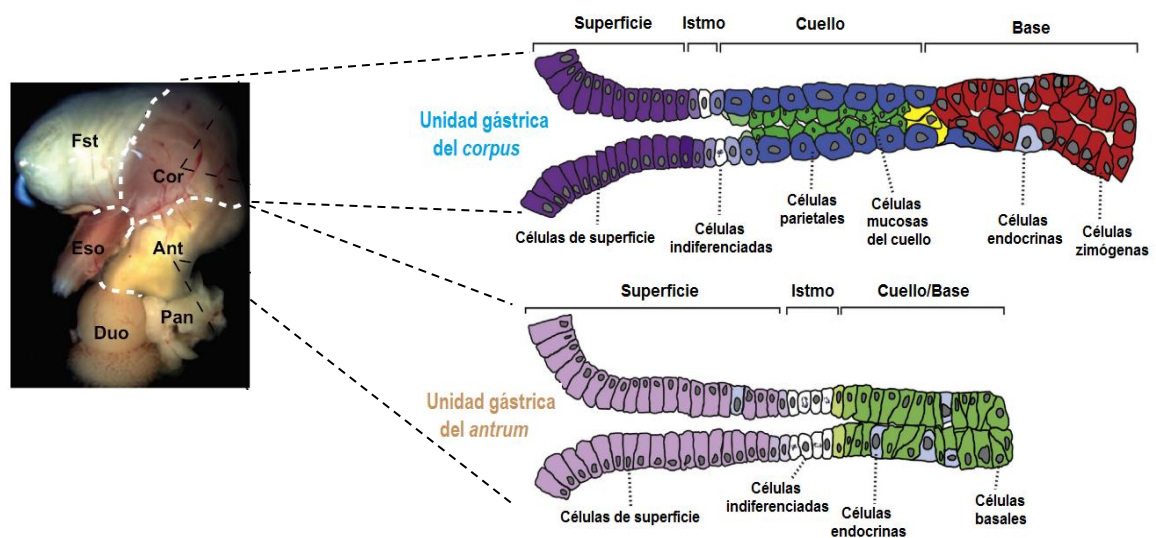


Figura 17. Organización de las unidades o glándulas gástricas del *corpus* y del *antrum*. Las unidades gástricas del *corpus* adulto contienen células de superficie (lila), células indiferenciadas (blanco), células parietales (azul), células mucosas del cuello (verde), células endocrinas (azul claro) y células zimógenas (rojo). Las unidades gástricas del *antrum* contienen células de superficie (lila claro), células indiferenciadas (blanco), células endocrinas (azul claro) y células basales (verde). Imagen extraída y modificada de Willet & Mills, 2016 y Kim & Shivdasani, 2016.

en la región proximal cuya función es la secreción de enzimas ácidas y digestivas, y el *antrum* en la región distal cuya función es la secreción de moco y ciertas hormonas, particularmente la gastrina (Fig. 16) (San Roman y Shivdasani, 2011). Ambos compartimentos están revestidos por un epitelio glandular formado por una sola capa de células epiteliales creando invaginaciones conocidas como glándulas gástricas (Fig.17) (Karam, 1998; Nomura *et al.*, 1998).

Los principales tipos celulares que constituyen las glándulas gástricas del *corpus* son: las células mucosas de la superficie, las células parietales secretoras de ácido, las células mucosas del cuello, las células principales, células secretoras de enzimas digestivas o zimógenas, las células endocrinas y las células ístmicas con características no diferenciadas, que probablemente funcionen como células madre multipotentes (Willet and Mills, 2016) (Fig. 17). Como se ha dicho anteriormente, una de las principales funciones del estómago es crear un ambiente ácido que permite la digestión. La acidez en el estómago es generada por las bombas de protones ATPasa-HK⁺, que se expresan en las células parietales en el estómago de los mamíferos (Kim and Shivdasani, 2016).

Las unidades glandulares del *antrum* contienen algunas células parietales y zimógenas dependiendo de la especie, pero principalmente están compuestas por células mucosas y células glandulares. Dispersas por el *corpus* y el *antrum* se encuentran las células endocrinas y cada tipo recibe el nombre de la hormona predominante que secretan (Willet and Mills, 2016) (Fig.17). El estómago tiene cinco tipos principales de células endocrinas: células G (gastrina), células D (somatostatina), células enterocromafinas (EC) (serotonina), células similares a las EC (histamina) y células X/A (ghrelina) (Kim and Shivdasani, 2016).

Aunque el estómago de humanos y de otros mamíferos como el ratón estén controlados por patrones del desarrollo similares, existen diferencias estructurales en el estómago de estas dos especies. Así, el estómago humano está recubierto por unidades glandulares tanto en la parte anterior como en la posterior, mientras que el estómago de los ratones contiene un compartimento anatómico llamado *forestomach* que va desde la parte anterior contigua a la mucosa esofágica hasta la curvatura superior o *fundus*. Este compartimento está formado por un epitelio escamoso estratificado y es el que permite el almacenamiento y la digestión mecánica de los alimentos (Fig.16). La

región formada por el *corpus* y el *antrum* en ratones es denominada comúnmente estómago posterior o *hindstomach* (Choi *et al.*, 2014).

Además, en el estómago de los humanos, hay células parietales que expresan las bombas ATPasa-HK⁺ en las glándulas gástricas del *antrum*, mientras que en los ratones este tipo celular no está presente en las unidades glandulares de este compartimento. Por otra parte, las células zimógenas de los ratones expresan el factor intrínseco gástrico, mientras que en humanos este factor es expresado por las células parietales (Choi *et al.*, 2014).

6. Organogénesis del estómago

Durante el desarrollo embrionario en regiones discretas del tubo primitivo del endodermo se activan distintos programas genéticos que darán lugar a los diferentes órganos endodermales (Choi *et al.*, 2014).

En la región posterior o *hindgut* se formará el intestino delgado y grueso, mientras que la región anterior o *foregut*, dará origen al hígado, páncreas, pulmones y el tracto gastrointestinal desde la faringe al duodeno anterior, incluyendo al estómago (Willet and Mills, 2016).

Aunque el epitelio del estómago es de origen endodérmico, en el estómago se encuentran otros tipos celulares procedentes de las otras dos capas germinales embrionarias. Los nervios entéricos que derivan del ectodermo, y el músculo liso y las células mesenquimales que derivan del mesodermo (Willet and Mills, 2016).

Se tiene poca información sobre la biología celular del estómago en comparación con otros órganos gastrointestinales como el hígado, el intestino y el colon. En particular, se sabe poco sobre las bases moleculares del desarrollo del estómago y la diferenciación de los linajes gástricos. Sin embargo, sí se conocen vías de señalización y factores de transcripción claves para el desarrollo del estómago en diferentes etapas (McCracken and Wells, 2018). Esto es posible ya que, aunque las diferencias estructurales y fisiológicas con los humanos hacen que los modelos animales sean insuficientes para conocer en detalle las bases moleculares del desarrollo del estómago, los mecanismos

que dirigen el desarrollo embrionario temprano de este órgano parecen estar mayormente conservados en todas las especies de vertebrados (Eicher, Berns and Wells, 2018).

El correcto desarrollo del estómago requiere una serie de procesos altamente regulados tanto espacial como temporalmente. En este apartado, resumiremos los mecanismos del desarrollo temprano del estómago, centrándonos en las vías de señalización y los reguladores transcripcionales conocidos hasta la fecha que controlan la especificación gástrica a partir del tubo intestinal primitivo, la regionalización del estómago, la morfogénesis y la diferenciación de los diferentes tipos celulares que componen el epitelio gástrico.

6.1 Especificación gástrica

La especificación gástrica es un proceso temporal y espacialmente dinámico. En el embrión, la expresión de factores de transcripción y vías de señalización en el endodermo temprano proporcionan las señales necesarias para que se forme con precisión el estómago entre el esófago y el intestino delgado (Grapin-Botton and Constam, 2007).

Algunos de los factores de transcripción y vías de señalización que parecen tener un papel importante en la especificación gástrica son FOXA1/2/3, HHEX, GATA4/6, HNF1 β , SOX2 y el ácido retinoico (AR) (Dufort et al., 1998; Martinez Barbera et al., 2000; Que et al., 2009).

El factor de transcripción HHEX es esencial en la regionalización del endodermo , en concreto de la región del *foregut* (Kim and Shivdasani, 2016) y se cree que concretamente podría participar en la regionalización del estómago.

La familia de factores de transcripción FOXA (*Forkhead box A*) se expresan a lo largo del endodermo temprano y son importantes en el desarrollo del hígado, el páncreas y el intestino. El papel específico de FOXA en el estómago aún no se conoce, pero se sabe que esta familia está involucrada en promover la expresión del factor de transcripción PDX1 en el intestino anterior embrionario. Ya que en el estómago *Pdx1* solo se expresa

en el *antrum* y en la región más proximal del duodeno, y no en el *corpus* más proximal (Offield *et al.*, 1996), se ha propuesto que los factores FOXA pudieran participar en la especificación y regionalización del estómago (Gao *et al.*, 2008).

Sox2 (*SRY-box 2*) se expresa en todo el intestino anterior embrionario, desde el endodermo faríngeo más anterior hasta el límite entre el futuro *antrum* y el duodeno. Quizás SOX2 tenga un papel aún más importante en la especificación del intestino anterior embrionario y del estómago de lo que se conoce actualmente. Parece que *Sox2* juega un papel importante en el establecimiento del límite gastrointestinal, donde se expresa juntamente con *Cdx2* (*Caudal Type Homeobox 2*), como se describirá más adelante (Que *et al.*, 2009).

6.2 Regionalización gástrica

Tras la especificación del estómago, la proliferación masiva de las células progenitoras forman las yemas de los órganos gastrointestinales. Las interacciones epitelio-mesenquimales dictan la formación del estómago durante el desarrollo fetal y reprimen las regiones del endodermo adyacentes como el esófago o el intestino, además de contribuir a la continua regeneración y diferenciación del epitelio a lo largo de la vida adulta. Tanto la correcta especificación como la regionalización del tracto gastrointestinal depende en gran medida de esta comunicación epitelio-mesénquima gástrica (Willet and Mills, 2016).

Entre las rutas de señalización más importantes en la regionalización estomacal se encuentra la ruta WNT y la ruta de *Bone Morphogenetic Protein* (BMP). La ruta WNT es necesaria para la diferenciación de la región del *corpus*, mientras que la supresión de la vía permite la especificación del dominio del *antrum*. En E12.5 la expresión de *Wnt11* es fuerte en el límite esófago-píloro y en el *forestomach*; *Wnt5a* se expresa en el *forestomach* y en una parte del *corpus*, y la expresión de *Wnt4* se limita a la región pilórica del epitelio del estómago y débilmente en el esófago (Lickert *et al.*, 2001). La vía de señalización de BMP, que deriva principalmente del mesénquima, influye en el desarrollo del epitelio gástrico (Willet and Mills, 2016).

Otros factores que parecen tener importancia en la regionalización del estómago son SOX2, NKX3.2, HOXA5 y HNF4. La reducción en la expresión de SOX2 en el *forestomach* afecta a su diferenciación y activa la expresión ectópica de genes específicos del estómago glandular (Que *et al.*, 2009). El factor de transcripción NKX3.2 se expresa principalmente en el mesénquima del *hindstomach*, al igual que el factor HOXA5, y ambos son esenciales para el correcto desarrollo de esta región (Aubin *et al.*, 2002).

La familia de factores de transcripción HNF4 (*Hepatocyte Nuclear Factor 4*) también se ha implicado en el control de la regionalización del epitelio gastrointestinal. Se ha demostrado que HNF4A es necesario para la citodiferenciación y la homeostasis del epitelio gástrico del ratón adulto (Moore *et al.*, 2016). Se expresa en el epitelio en desarrollo y maduro del estómago, en el intestino delgado y en el colon, mientras que HNF4G se expresa solo en el colon (Fig. 18) (Taraviras *et al.*, 2000; Duncan *et al.*, 2006; Drewes *et al.*, 2015). Durante el desarrollo embrionario, una de las pocas diferencias conocidas entre los diferentes dominios gástricos es la expresión de *Pdx1*, que se localiza

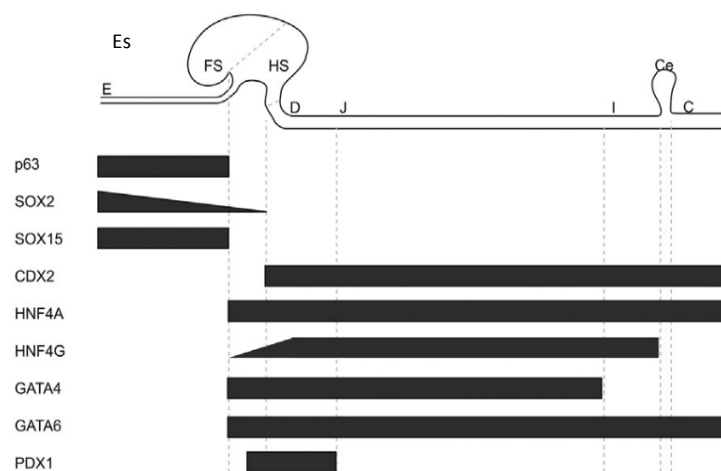


Figura 18. Patrón de expresión de los factores de transcripción claves en la regionalización del tracto gastrointestinal. Las barras representan la expresión de los factores de transcripción y los gradientes a lo largo del eje cefalo-caudal del tracto gastrointestinal incluyendo el esófago (Es), el *forestomach* (FS), el *hindstomach* (HS), el duodeno (D), el yeyuno (J), el íleon (I), el ciego (Ce) y el colon (C). Imagen extraída de Thompson *et al.*, 2018.

específicamente en la región del *antrum* y del duodeno más proximal a E10.5 (Bjerknes and Cheng, 2002). Sorprendentemente, el papel de PDX1 en la regionalización estomacal no se ha estudiado en profundidad, excepto por su papel en la diferenciación

de las células G del *antrum* en estadios embrionarios más avanzados (McDonald *et al.*, 2008).

7. Definición del límite gástrico anteroposterior

Probablemente el proceso que establece el límite gastroesofágico sea diferente en ratones que en humanos debido a las diferencias en la anatomía gástrica entre ambas especies. En el ratón el epitelio gástrico escamocolumnar termina en la convergencia entre el *forestomach* y el *hindstomach*. Sin embargo, en humanos se localiza en el límite entre el estómago y el esófago. Por lo tanto, parece probable que el límite entre el *forestomach* y el *hindstomach* en embriones de ratón sea análogo al límite gastroesofágico en el desarrollo humano (Willet and Mills, 2016).

Varios factores de transcripción y rutas de señalización han sido identificados en el establecimiento del límite gastroesofágico. De E11.5 a E15.5 el ligando Sonic Hedgehog (*Shh*) se expresa específicamente en el *forestomach* mientras que en el epitelio glandular del *hindstomach* se expresa el ligando Indian hedgehog (*Ihh*) (Bitgood and McMahon, 1995). Por lo tanto, existe un límite en la expresión de *Shh* y *Ihh* que delimita la unión entre el *forestomach* y el *hindstomach*.

En el límite gástrico-posterior, entre el estómago y el intestino, juegan un papel importante los genes *Sox2* y *Cdx2*. *Sox2* se expresa tanto en el esófago como en el estómago durante gran parte del desarrollo, pero es en E8.5 cuando se identifica el límite de expresión de *Sox2-Cdx2*. Por lo tanto, mientras que *Cdx2* se requiere para la especificación del intestino (Gao *et al.*, 2008; Grainger, Savory and Lohnes, 2010) y se expresa de forma selectiva en el intestino de ratón, los niveles de *Sox2* son altos en el epitelio esofágico embrionario y en el epitelio del estómago. De hecho, la reducción de los niveles de expresión de *Sox2* conducen a una diferenciación defectuosa de ambos tejidos. Por lo tanto, *Sox2* y *Cdx2* tienen funciones clave para establecer el límite gastrointestinal y mantener el destino de ambos órganos (Que *et al.*, 2009).

8. Límites de expresión génica entre el estómago y los órganos adyacentes

Al igual que la actividad de ciertos factores de transcripción marcan los distintos dominios dentro del estómago, otros factores juegan un papel importante en la delimitación de los dominios entre el estómago y los otros órganos adyacentes en desarrollo, como el páncreas y el hígado.

El límite entre el estómago y el páncreas también parece dictado por la actividad de ciertos factores de transcripción en particular. Por ejemplo, la eliminación de *Hes1* en el ratón provoca el desarrollo de páncreas ectópico en el estómago (Fukuda *et al.*, 2006). Y la expresión ectópica del factor específico de páncreas *Ptf1a* convierte el tejido del estómago en páncreas (Willet *et al.*, 2014).

Otra ruta que parece ser clave en el establecimiento de los límites del estómago durante el desarrollo es Hedgehog. Estudios previos demostraron que la inhibición de *Shh* es necesaria para la formación de la yema pancreática e iniciar el programa transcripcional pancreático (Apelqvist, Ahlgren and Edlund, 1997; Hebrok, Kim and Melton, 1998). Sin embargo, un estudio más reciente de la Dra. Sussel va más allá y muestra que la represión de Hedgehog (Hh) delimita el dominio del páncreas, intestino y estómago. De hecho, cuando se interrumpe la represión de Hh los progenitores pancreáticos ventrales y dorsales adquieren un linaje intestinal y estomacal, respectivamente, como se explicará más adelante (Xuan and Sussel, 2016).

9. Morfogénesis del epitelio gástrico

Como se ha explicado anteriormente, el estómago está recubierto por un epitelio glandular en la región del *hindstomach*. La correcta morfogénesis de este epitelio es esencial para las principales funciones del estómago, como la secreción de mucinas y el mantenimiento de un ambiente ácido. El desarrollo y la diferenciación de la mucosa gástrica están controlados por la interacción de proteínas de señalización y reguladores transcripcionales, los cuales mantienen los límites entre los diferentes compartimentos del estómago. Entre ellos se encuentra P63, SOX2, Hh, HOXA5 y PDX1.

En el *forestomach* el factor de transcripción P63 es considerado un regulador esencial en el desarrollo del epitelio escamoso estratificado (Daniely, 2004; Koster *et al.*, 2004; Yu, Slack and Tosh, 2005; Senoo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2012). El factor SOX2 también es crucial en la especificación de este epitelio escamoso y la deficiencia de SOX2 en el desarrollo del *forestomach* posterioriza el epitelio (Que *et al.*, 2007). La señalización de Hh también es un factor esencial en la regionalización del epitelio del estómago. Los estómagos que carecen de SHH exhiben un dominio glandular muy expandido a expensas del dominio del *forestomach*. Incluso el dominio glandular de estos mutantes se posterioriza expresando algunos marcadores intestinales (Ramalho-Santos, Melton and McMahon, 2000).

Así mismo, la pérdida de HOXA5 interrumpe la señalización de Hh epitelial en el estómago en desarrollo, y la expresión de IHH se expande en el dominio del *forestomach* a expensas de la expresión de *Shh*, posteriorizando el epitelio (Aubin *et al.*, 2002). Por otro lado, la expresión inducida de *Shh* en el *hindstomach* compromete el dominio de expresión de *Ihh* y anterioriza el epitelio (Haumaitre *et al.*, 2005; Spencer-Dene *et al.*, 2006). En estos casos, el epitelio mutante se engrosa, y hay una pérdida de células glandulares. En conjunto, el equilibrio entre la expresión de *Shh* y *Ihh* es esencial para modelar el epitelio columnar del *hindstomach* y el epitelio escamoso estratificado del *forestomach*.

Pdx1 se expresa en el *antrum* gástrico y el duodeno proximal, y tiene una importante función en la especificación y morfogénesis de estas estructuras (Fujitani *et al.*, 2006). De hecho, la expresión de *Pdx1* se puede usar durante el desarrollo para distinguir los progenitores gástricos del *antrum* (SOX2⁺ GATA4⁺ PDX1⁺) de los progenitores del *corpus* (SOX2⁺ GATA4⁺ PDX1⁻).

En resumen, este conjunto de factores de transcripción desempeña funciones esenciales en la definición del límite gástrico anterior y posterior, sin embargo, aún no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares subyacentes.

9.1 Diferenciación celular del epitelio gástrico glandular

Aunque los mecanismos que controlan la citodiferenciación epitelial en el estómago son menos conocidos en comparación con el intestino, a continuación, se describen las vías de señalización y factores de transcripción claves en el desarrollo de los diferentes tipos celulares del epitelio gástrico glandular.

Aproximadamente entre E14.5 - E16.5, las células endocrinas, parietales y principales se diferencian, y las glándulas comienzan a invaginarse en el mesénquima. Entre E16.5 y 2 semanas del desarrollo el estómago glandular se organiza en su forma adulta. Sin embargo, el estómago murino no alcanza la organización adulta con la diferenciación completa de las células principales y endocrinas hasta las 6 a 8 semanas postnatales (Keeley and Samuelson, 2010).

Se han identificado grupos de genes que se expresan en el epitelio en diferentes momentos de la formación de las glándulas gástricas. El primer grupo de genes (*Sox2*, *Shh*, *cSP* y *PPARγ*) se expresan antes de la formación de las glándulas. El segundo grupo incluye genes (*Foxa2*, *Sox3*, *cfos* y *junD*) que se expresan antes y durante la formación de las glándulas. El último conjunto de genes (*Smad8*, *Delta* y *Notch*) se expresa específicamente después de la formación de las glándulas (Yasugi and Mizuno, 2008).

No se conocen los factores específicos necesarios o suficientes para la especificación de los diferentes tipos celulares que conforman el epitelio glandular gástrico (Willet and Mills, 2016). Es posible que todos los tipos de células maduras se especifiquen a partir de un único progenitor multipotente que persista durante toda la vida o, a su vez, podría haber numerosos progenitores (Bjerknes and Cheng, 2002; McDonald *et al.*, 2008). Los únicos tipos celulares de los cuales se conoce los factores genéticos determinantes y los marcadores progenitores son las células endocrinas del *antrum*, que están controladas por los genes reguladores *Ascl1*, *Ngn3*, *Pdx1*, *Nkx6.3*, *Pax4/6* y *Arx* (Willet and Mills, 2016).

El gen *Ascl1* es necesario para todos los linajes endocrinos del estómago (Kokubu, Ohtsuka and Kageyama, 2008), mientras que *Ngn3* y *Pax6* son necesarios para producir células G y D (Larsson *et al.*, 1998; Jenny *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Más adelante, *Nkx6.3*, *Pdx1* y *Arx* se requieren selectivamente para las células G (Larsson *et al.*, 1996;

Choi *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2012) y *Pax4* es esencial para las células D (Larsson *et al.*, 1998).

Aunque en general no está claro qué controla la especificación del resto de los linajes celulares en el estómago, algunos factores se han implicado en su maduración. Se ha demostrado que el factor de transcripción SPDEF es crucial para la maduración de las células mucosas en el *antrum* (Horst *et al.*, 2010). *Foxq1* es necesario para la expresión de la MUC5AC en células de superficie (Verzi, 2008). Y *Xbp1* y *Mist1* son importantes para la maduración ultraestructural de las células principales (Ramsey *et al.*, 2007; Huh *et al.*, 2010). Las células mucosas del cuello (progenitoras de las células principales) surgen en roedores en el momento del destete en un proceso que depende en parte de TGF- α y EGFR, que desempeñan un papel importante en su maduración (Willet and Mills, 2016).

Algunas de las vías de señalización y factores de transcripción que participan en la especificación y regionalización del estómago también tienen función en el mantenimiento de la identidad celular del epitelio gástrico glandular.

La vía de señalización de WNT desempeña un papel esencial en la identidad de las células epiteliales dentro de los dominios proximal (*fundus*) y distal (*antrum*) del *hindstomach*. Un marcador clave que distingue estos dominios es el factor PDX1, que está presente en las glándulas del *antrum* pero ausente en las glándulas fúndicas. Cuando la señalización de WNT se bloquea temprano durante el desarrollo del epitelio del *hindstomach* ocurre una inducción de PDX1. Esto sugiere que la señalización de WNT es necesaria para especificar las células de las glándulas fúndicas frente a las del *antrum* durante el desarrollo (McCracken and Wells, 2018).

Por otra parte, la señalización de Notch regula el comportamiento de las células madre en el *antrum* y su inhibición interrumpe la diferenciación y la renovación del epitelio glandular (Demitrack *et al.*, 2015). La señalización de BMP, a través de BMPR1A, regula la proliferación y diferenciación de las células mucosas en el *antrum*. En ausencia de BMPR1A, las células mucosas del *antrum* hiperproliferan y dejan de producir la mucina MUC5AC (Bleuming *et al.*, 2007; Jae Huh, Mysorekar and Mills, 2010).

El mesénquima también participa en la citodiferenciación. Se ha demostrado que FGF (*Fibroblast Grow Factors*) media la señalización a través de los límites epitelio-mesenquimales para promover la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo del estómago (Nyeng *et al.*, 2007; Geske, 2008; Yongjun *et al.*, 2008). La pérdida de *Fgf10* o *Fgfr2*, ambos derivados del mesénquima, da como resultado una proliferación reducida y una morfogénesis glandular defectuosa en el epitelio gástrico (Shin *et al.*, 2006; Spencer-Dene *et al.*, 2006). En ratones, se demostró que *Wnt5a* activa la vía WNT/PCP que es esencial para mantener la polaridad, la morfogénesis y el crecimiento de las células epiteliales (Matsuyama, Aizawa and Shimono, 2009). EGF (*Epidermal Grow Factor*) es otro factor epitelial importante requerido para la proliferación normal y el crecimiento de la mucosa en ratones (McCracken and Wells, 2018).

10. Importancia del factor de transcripción GATA4 en el epitelio gástrico glandular

Los miembros de la familia de factores de transcripción GATA, *Gata4* y *Gata6* se expresan en el endodermo temprano incluido el que dará lugar al epitelio del tracto gastrointestinal. Mientras que *Gata6* se expresa en el epitelio glandular del *hindstomach*, a lo largo de todo el intestino delgado y en el colon, la expresión de *Gata4* cesa en el límite yeyuno/íleon en el intestino delgado (Fig. 18) (Jacobsen *et al.*, 2002; Bosse *et al.*, 2006; Battle *et al.*, 2008; Beuling *et al.*, 2012; Thompson, DeLaForest and Battle, 2018).

En el estómago en desarrollo de ratones, *Gata4* se expresa en las células del epitelio más proximal, y está ausente en la región distal. A E14.5, la expresión de *Gata4* es evidente en el epitelio del *hindstomach* pero no en el del *forestomach*. A E18.5 su expresión se detecta en el epitelio glandular gástrico, y en el estómago adulto la expresión de *Gata4* es más evidente en las células del cuello, del istmo y en las células de superficie (Jacobsen *et al.*, 2002). El factor GATA6 tiene un patrón de expresión similar, sin embargo no se ha investigado su papel en el desarrollo del estómago (Freyer *et al.*, 2015).

Dada la temprana letalidad de los mutantes convencionales para *Gata4*, se han usado otras estrategias para esclarecer el papel de GATA4 en la especificación definitiva del endodermo gástrico. En un estudio se generaron embriones quiméricos que contenían células nulas para *Gata4*. Los análisis de marcadores de diferenciación gástrica en los embriones quiméricos para GATA4, determinaron que las células *Gata4*^{-/-} presentaban defectos en la diferenciación gástrica. El epitelio de estos ratones mosaicos no expresaba marcadores asociados a las células parietales, como la ATPasa-HK⁺, no presentaban células de superficie positivas para mucina y tampoco expresaban el pepsinógeno. Por lo tanto, la deficiencia de *Gata4* está relacionada con defectos en la diferenciación de las células parietales, zimógenas y células de superficie. Además, este epitelio glandular tampoco expresaba *Ihh* y aumentaba la expresión de *Shh* (Jacobsen *et al.*, 2002).

Sin embargo, en estos estudios no se esclarece si los defectos en la diferenciación de las células del epitelio glandular son debidos a un papel autónomo de GATA4 o no, ya que la señalización aguas abajo de GATA4 en dominios distintos al del epitelio glandular del estómago podrían afectar a la diferenciación de este epitelio.

Otro estudio realizado con una versión mutante de *Gata4*, los ratones *Gata4*^{ki/ki}, la cual es incapaz de interaccionar con su cofactor FOG1 (*Friend Of GATA 1*) (Tsang *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999; Kim and MacDonald, 2002) confirmó la necesidad de la actividad de

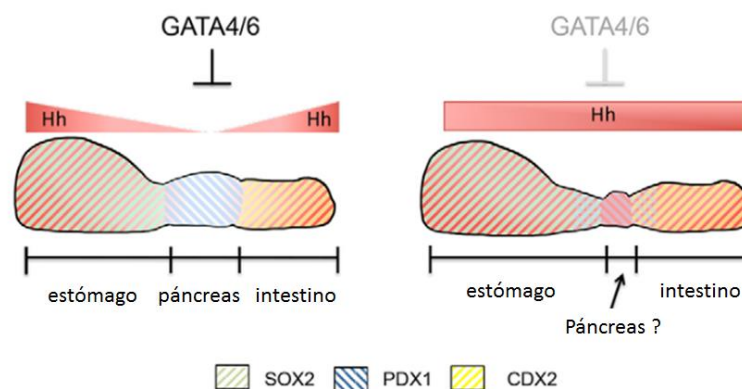


Figura 19. Esquema resumen de las consecuencias de la falta de GATA4 y GATA6 en el epitelio pancreático. GATA4/6 reprimen la señalización de Hedgehog (Hh) en el endodermo pancreático del intestino anterior embrionario para permitir la expresión de *Pdx1* (rayas azules). En ausencia de GATA4/6, se activa la señalización de Hh en el dominio de endodermo prepancreático. Como resultado, los progenitores pancreáticos ventrales y dorsales deficientes adquieren un linaje intestinal y estomacal, respectivamente. Imagen modificada de Xuan & Sussel, 2016.

GATA4 para la correcta diferenciación del epitelio glandular. En los ratones *Gata4*^{ki/ki}, la expresión del ligando *Shh* se extiende desde el *forestomach* hasta el *hindstomach* (Jacobsen *et al.*, 2005). Estos resultados junto con los estudios en ratones quiméricos para *Gata4* sugieren una anteriorización del epitelio distal en ausencia de GATA4 y el papel de este factor en el mantenimiento de la identidad del epitelio glandular.

En este sentido, otros estudios más recientes del laboratorio de la Dra. Sussel han mostrado la importancia de los factores GATA en el mantenimiento de la identidad celular, describiendo a los factores GATA4/6 como reguladores de la identidad del endodermo a través de la inhibición de la señalización de Hh. Mostraron que los progenitores pancreáticos ventrales y dorsales deficientes para *Gata4* y *Gata6* adquieren un linaje intestinal y estomacal, respectivamente (Xuan and Sussel, 2016). El análisis transcriptómico de las yemas pancreáticas de estos ratones reveló que disminuían los marcadores característicos de progenitores pancreáticos y aumentaron los asociados al intestino y factores de transcripción gástricos. Además, aumentó la expresión de genes de la ruta Hh (Fig.19).

En el páncreas GATA4 y GATA6 reprimen a Hh a través de su unión a sitios GATA situados en una región reguladora o *enhancer* del gen *Shh* denominada MACS1. En ausencia de GATA4 y GATA6, la vía Hh se activa en el dominio endodérmico prepancreático inhibiéndose la expresión de *Pdx1* y permitiendo la expresión de *Sox2* y *Cdx2* (Xuan and Sussel, 2016)

Estudios previos ya habían visto que se requiere la inhibición de *Shh* en el dominio pancreático para su correcto desarrollo (Hebrok *et al.*, 2000). Además, la expresión ectópica de *Shh* en el endodermo pancreático convierte el mesodermo pancreático en mesénquima intestinal, provocando una menor formación del páncreas y una regionalización expandida del estómago o el intestino (Apelqvist, Ahlgren and Edlund, 1997; Haumaitre *et al.*, 2005).

Estos resultados indican que GATA4 y GATA6 desempeñan funciones esenciales en el mantenimiento de la identidad del páncreas y la importancia de la inhibición mediada por GATA4/6 de la señalización de Hh como un mecanismo importante en la regulación de la especificación del endodermo pancreático durante el modelado del tubo intestinal.

Aunque estos experimentos han aportado mucha luz al papel de GATA4 en el epitelio gástrico glandular, se conoce mucho más su papel en la citodiferenciación del epitelio intestinal que en el del epitelio gástrico.

Estudios *in vitro* de transactivación y ensayos EMSA han mostrado que GATA4 y/o GATA6 regulan genes específicos de las células parietales (bomba ATPasa-HK⁺) (Mushiaki *et al.*, 1994; Nishi *et al.*, 1997), de células de superficie (*trefoil factors 1 and 2*; TTFs) (Al-Azzeh *et al.*, 2000), de células del cuello zimógenas (pepsinógeno) (Sakamoto, Saiga and Yasugi, 1998) y de células mucosas (MUC5AC) (Jonckheere *et al.*, 2012). Por lo que GATA4 y GATA6 podrían tener funciones diferentes pero superpuestas en la mucosa gastrointestinal (Haveri *et al.*, 2008).

11. Formación del páncreas ectópico en el sistema digestivo

Como hemos visto, en la organogénesis y morfogénesis del estómago, el sitio de formación de los órganos y tejidos está determinado por programas de desarrollo estrictamente coordinados que involucran la interacción entre señales extracelulares y una red de factores de transcripción intracelulares. Sin embargo, a veces, estos mecanismos no funcionan correctamente, y los tejidos se forman en ubicaciones ectópicas. En el caso del desarrollo del páncreas ectópico, no se conoce bien el mecanismo patogénico. Comprender el mecanismo que da origen al tejido ectópico sería un gran avance en la capacidad de comprender el programa de desarrollo en la organogénesis, especificación y diferenciación de los órganos ortotópicos.

El páncreas heterotópico es una anomalía congénita y se define como la presencia de tejido extrapancreático sin continuidad vascular o anatómica con el páncreas (Christodoulidis *et al.*, 2007). El páncreas heterotópico tiene una dotación genética, una función fisiológica y una exposición ambiental local similar a la del páncreas ortotópico (Zhang *et al.*, 2007).

El primer caso de tejido pancreático heterotópico fue descrito por Jean Schultz en 1729, y se encontró en el divertículo de Meckel, que es un pequeño ciego que se encuentra en el intestino delgado tras el nacimiento y es considerado un órgano vestigial. Sin

embargo, no fue hasta 1859 cuando Klob lo confirmó mediante análisis histológicos (Klob, 1859).

11.1 Características histopatológicas

En la mayoría de los casos detectados, el páncreas heterotópico está formado por una masa firme con forma lobular y con unos límites bien definidos con los tejidos circundantes. La mayoría de las lesiones (80%) son solitarias y menores de 3 cm, pero pueden variar en el tamaño desde 0,2 a 5 cm (Park *et al.*, 2000; Mortelé KJ, Rocha TC, Streeter JL, 2006).

En 1909, Heinrich propuso la clasificación del páncreas heterotópico en tres tipos, sin embargo, su clasificación fue modificada por Gaspar-Fuentes en 1973. El tipo I de heterotopia consiste en un tejido típico pancreático con acinos, ductos e islotes, similar a lo que se observa en el páncreas normal. El tipo II está compuesto únicamente por ductos. El tipo III se caracteriza por estar formado solo por tejido acinar (páncreas exocrino). Y el tipo IV está compuesto por células del islote (páncreas endocrino) (Gaspar Fuentes A, Campos Tarrech JM, Fernández Burgui JL, Castells Tejón E, Ruíz Rossello J, Gómez Pérez J, 1973). Una de las características que más llaman la atención del páncreas ectópico, es que en el 35-90% de los casos se observa la formación de una abertura ductal central (Park *et al.*, 2011; Gottschalk, Dietrich and Jenssen, 2018).

11.2 Prevalencia y sintomatología

Para el diagnóstico de la presencia de páncreas heterotópico se utilizan técnicas de imagen, sin embargo, debido a su similitud con un tumor primario o metastático son esenciales las biopsias y posterior análisis histológicos para su correcto diagnóstico (Yuan *et al.*, 2009). Aunque la mayoría de los pacientes con páncreas heterotópico son asintomáticos, en algunos casos se pueden presentar síntomas, como dolor abdominal y distensión. El dolor puede ser debido a la función endocrina y exocrina del tejido pancreático ectópico, relacionado con la secreción de hormonas y enzimas, responsables de la inflamación y de la irritación de los tejidos involucrados. De hecho,

también se han descrito casos en los que existe sangrado gastrointestinal (Ormarsson, Gudmundsdottir and Mårvik, 2006). No existe un tratamiento efectivo para los síntomas provocados por el páncreas heterotópico, y la extirpación quirúrgica es la mejor opción (Christodoulidis *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009; Gokhale *et al.*, 2010).

El tejido pancreático heterotópico es susceptible a las mismas condiciones patológicas que pueden afectar al páncreas ortotópico, incluida la pancreatitis, la formación de pseudoquistes y las neoplasias benignas y malignas (Fukino *et al.*, 2015). Por lo tanto, el páncreas ectópico se puede considerar también una fuente de lesiones malignas.

En los casos asintomáticos, la presencia de páncreas ectópico es encontrada *postmortem* en autopsias y su frecuencia varía de 0,5 a 13,7%. La edad donde se encuentra prevalentemente es de 30-50 años con predominio masculino, con una frecuencia entre hombres y mujeres de 3:1 (Mulholland *et al.*, 2004).

11.3 Localización

El páncreas heterotópico se puede localizar en cualquier posición de la cavidad abdominal, frecuentemente en el tracto gastrointestinal superior. La localización más común es en el estómago en un 25-38%, en el duodeno en el 17-36% y en el yeyuno en el 15-21,7% de los casos. Otras localizaciones menos frecuentes son el esófago, la vesícula biliar, el conducto biliar, el bazo, el mesenterio, el mediastino y las trompas de Falopio (Chandan and Wang, 2004).

Las lesiones pancreáticas heterotópicas en el tracto gastrointestinal se clasifican como subepiteliales, y se define como una masa cubierta con mucosa normal (Lee *et al.*, 2010). Específicamente en el estómago, se encuentran en la capa submucosa, la capa muscular y en la capa subserosa con una prevalencia de 73%, 17% y 10%, respectivamente (Gaspar Fuentes A, Campos Tarrech JM, Fernández Burgui JL, Castells Tejón E, Ruíz Rossello J, Gómez Pérez J, 1973). La mayoría de las lesiones gástricas se localizan en el *antrum* debajo del epitelio glandular de la mucosa, en un 85-95%, siendo más comunes a lo largo de la curvatura mayor (Christodoulidis *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009; Gokhale *et al.*, 2010).

11.4 Características embriológicas y teorías del origen

Aunque las bases embriológicas del páncreas heterotópico no se conocen, se han propuesto varias teorías para explicar los mecanismos celulares de la patogenicidad y de la aparición del páncreas heterotópico.

Se han propuestos tres teorías para explicar el origen de la heterotopia pancreática: i) fallos en la migración de progenitores pancreáticos, ii) metaplasia y iii) presencia de células multipotentes que yacen en el endodermo primitivo.

Dada la proximidad del páncreas al estómago y al duodeno a lo largo del intestino anterior primitivo, se ha propuesto el desplazamiento de las células pancreáticas en el sistema gastrointestinal en desarrollo como una hipótesis para la heterotopia pancreática. Durante la rotación embrionaria del intestino proximal y la fusión de las partes dorsal y ventral del páncreas, pequeños segmentos se podrían separar y continuar desarrollándose en una ubicación ectópica (Shin, Jeong and Kang, 2007; Kim *et al.*, 2015). Esta teoría explicaría el hecho de que, en la mayoría de los casos, el páncreas heterotópico se encuentra en otros tejidos adyacentes al páncreas en el endodermo, como el estómago y el duodeno.

Una hipótesis alternativa implica un proceso metaplásico en el cual el tejido pancreático ectópico surgiría de áreas endodérmicas que sufren metaplasia pancreática que migrarían a la submucosa del intestino durante la embriogénesis (Chandan and Wang, 2004), lo que reflejaría la plasticidad de las células endodermales en cambiar su fenotipo.

Por último, una tercera teoría propone que serían células multipotentes endodérmicas las que se diferenciarían en tejido pancreático (Park *et al.*, 2014). Esta teoría explicaría la presencia de tejido pancreático ectópico en regiones más alejadas del endodermo pancreático como el hígado o los pulmones.

11.5 Mutaciones génicas que conducen a la heterotopia pancreática

Hasta la fecha, la presencia de tejido pancreático heterotópico no ha sido asociado a mutaciones en ningún gen en humanos. En ratones, varios estudios han implicado a Hh

y *Hes1*, ligandos de las rutas de señalización Hedgehog y Notch respectivamente, con la formación de páncreas ectópico. La inhibición de la señalización de Hedgehog (Hh) en el tubo digestivo proximal embrionario induce la formación de páncreas ectópico y la expresión de marcadores pancreáticos en el estómago y el duodeno en ratones (Hebrok, Kim and Melton, 1998; Kawahira, 2003).

En estudios más recientes se ha evaluado el papel que juega la ruta de señalización Notch en la formación del tejido pancreático ectópico. La ruta Notch está conservada en la evolución y regula la diferenciación celular durante el desarrollo de diferentes tejidos y órganos (Artavanis-tsakonas *et al.*, 1999). La activación del receptor Notch provoca su translocación intracelular, el cual actúa como un activador transcripcional de los genes *Hes* (*Hes Family BHLH Transcription Factor*), los cuales participan en la diferenciación de varios tipos celulares (Kageyama, Ohtsuka and Tomita, 2000). El factor de transcripción *Hes1*, inhibe la expresión del gen pancreático proendocrino *Ngn3*, durante la diferenciación endocrina y ductal del páncreas (Kageyama, Ohtsuka and Tomita, 2000; Lee *et al.*, 2001).

El factor de transcripción HES1 se expresa en diferentes regiones del endodermo incluidos el estómago y el epitelio biliar extrahepático a lo largo de todo el desarrollo embrionario (Jensen *et al.*, 2000). En los experimentos realizados por (Sumazaki *et al.*, 2004) observaron que el epitelio biliar de los ratones *Hes1* *-/-* expresaba de forma ectópica *Ngn3*, se diferenciaban en células endocrinas y exocrinas, y formaban acinos y estructuras similares a islotes pancreáticos. De hecho, el conducto biliar era reemplazado completamente por tejido pancreático en los embriones de estos ratones. Estos resultados sugieren que *Hes1* inhibe el programa de diferenciación pancreática endocrina en el epitelio biliar mediante la represión de la expresión del gen *Ngn3*, por lo que controla la diferenciación endocrina endodérmica y la organogénesis biliar.

En otros experimentos realizados por Fukuda y colaboradores en el año 2006 con ratones *knockout Hes1*, se observó la presencia de un páncreas ectópico en el estómago, el duodeno y el conducto biliar. En este estudio se observó la expresión de *Ptf1a* en regiones discretas del estómago y del duodeno, así como en todo el conducto biliar. El

trazado de linaje de *Ptf1a* en ratones *Hes1 knockout* reveló que todas las células ectópicas que expresaban *Ptf1a* se diferenciaban en células pancreáticas maduras, incluidas células exocrinas, endocrinas y ductales (Fukuda *et al.*, 2006), sugiriendo un mecanismo de metaplasia en células del estómago y duodeno a células pancreáticas.

Sin embargo, un estudio más reciente ha reevaluado la teoría de metaplasia sugerida en el estudio anterior sobre la formación de páncreas ectópico en ratones mutantes *Hes1*. En este estudio Jørgensen y colaboradores, propone que el tejido pancreático ectópico adherido al estómago en los mutantes *Hes1* se debe a una disgenesia extrema del páncreas dorsal. Este estudio propone que la desinhibición de *Ngn3* por la ausencia de *Hes1*, provoca una malformación del páncreas dorsal, el cual se extiende sobre la curvatura mayor del estómago llegando incluso a fusionar ambos epitelios, el pancreático y el del estómago. Esta teoría se ve apoyada por el hecho, de que los ratones *Hes1* *-/-* *Neurog3* *-/-* no presentan páncreas ectópico y la morfología del páncreas dorsal es normal (Jørgensen *et al.*, 2018). Por tanto, una migración aberrante de precursores pancreático en vez de un mecanismo de metaplasia explicaría la heterotopia pancreática en ausencia de *Hes1*.

II. OBJETIVOS

PARTE A. Papel del factor de transcripción GATA6 en la función de la célula β

Los estudios previos de genética humana en pacientes con agenesia pancreática han revelado que las mutaciones en el gen *GATA6* son la causa más prevalente de esta enfermedad. Posteriores estudios genealógicos de estos pacientes muestran que estas mutaciones tienen un amplio espectro de fenotipo que van desde la agenesia pancreática hasta el desarrollo de diabetes en el adulto, con o sin insuficiencia exocrina. Estos resultados permiten hipotetizar que GATA6 juega un papel fundamental en el control de la homeostasis de la glucosa y en la función de la célula β . Para determinar la contribución de este factor a estos procesos, en esta tesis se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Estudiar el papel del factor de transcripción GATA6 en la homeostasis de la glucosa.

Mediante el uso de un modelo *knockout* condicional de ratón, se inactivará el gen *Gata6* en el endodermo pancreático. Analizaremos la capacidad de respuesta a la glucosa de los ratones deficientes para *Gata6*.

Objetivo 2. Determinar el papel de GATA6 en la función de las células β pancreáticas.

Se analizará la capacidad de biosíntesis y secreción de insulina de las células β deficientes para *Gata6*. Mediante análisis de *Affimetrix* se determinarán los cambios en la expresión génica global de los islotes de los ratones deficientes para *Gata6*.

Objetivo 3. Determinar si GATA6 es un regulador directo de *Pdx1* en células β adultas.

PARTE B. Contribución de GATA4 a la diferenciación e identidad de las células del epitelio glandular del estómago

Estudios previos usando ratones quiméricos para *Gata4* sugerían que este factor de transcripción es necesario para la diferenciación de las células epiteliales del estómago glandular. Sin embargo, estos estudios no demostraban un papel autónomo de GATA4 en este proceso, ya que señales aguas abajo de *Gata4* en células de tejidos vecinos pudieran ser las causantes de esos defectos en la diferenciación celular. Nuestra hipótesis de trabajo es que GATA4 mantiene la identidad de las células del epitelio gástrico y es necesaria para la correcta diferenciación. Para estudiar el papel de GATA4 en la diferenciación del epitelio gástrico en esta tesis se han realizado los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 4. Analizar la contribución del factor de transcripción GATA4 en el mantenimiento de la identidad celular y en la diferenciación del epitelio gástrico glandular.

Mediante el uso de un modelo *knockout* condicional de ratón, se inactivará el gen *Gata4* en el dominio *Pdx1*, que incluye los progenitores pancreáticos, el *antrum* del estómago y la parte más proximal del duodeno. Analizaremos la morfología de las glándulas gástricas y la expresión de diferentes marcadores de diferenciación del epitelio gástrico glandular.

Mediante el uso de línea celular gástrica humana, AGS, se analizará la contribución de GATA4 al mantenimiento de la identidad celular mediante experimentos de inactivación de *Gata4* usando un siRNA específico.

Objetivo 5. Analizar la formación de páncreas ectópico en el estómago de los ratones deficientes en *Gata4*.

Se analizará el tejido ectópico pancreático a distintos estadios embrionarios y adultos en ratones deficientes para *Gata4*. Se usarán técnicas de

inmunofluorescencia e inmunohistoquímica para marcadores de células pancreáticas ductales, acinares y endocrinas.

Objetivo 6. Estudiar la expresión de *GATA4* en páncreas ectópico de biopsias de pacientes

Se comparará la expresión de *GATA4* en muestras de páncreas ectópico humanas y en páncreas ortotópico mediante inmunodetección. Se analizará la correlación de la expresión de *GATA4* en el páncreas ectópico y en el epitelio glandular en las biopsias de los pacientes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

1.1 Animalario y protocolos de manipulación de animales

Las diferentes líneas experimentales de ratón utilizadas en esta tesis fueron estabuladas en la Unidad de Recursos Biológicos del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Los animales fueron alojados en microaislados ventilados, con un sistema de climatización totalmente automatizado y conectado a un sistema de generador, en condiciones óptimas de temperatura y humedad, y con un ritmo circadiano de 12h luz/12h oscuridad. Los ratones recibían agua y alimento *ad libitum* (excepto en caso de ayuno por requerimientos experimentales). En todos los experimentos los ratones consumieron el pienso 2914 irradiado (T.2914.4X4.5R, Harlan). Los ratones se sometieron a controles sanitarios siguiendo las recomendaciones de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

Los usuarios que manipularon y realizaron procedimientos con los animales cumplían los requisitos de capacitación recogidos en el artículo 15 del RD 53/2013 de 1 de febrero y desarrollados en la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo. La autora de esta tesis obtuvo su certificado de experimentación animal en el Centro de Estudios Biosanitarios (CEB) con categoría C, en septiembre de 2014. El manejo de los animales se realizó evitando el sufrimiento innecesario de los animales, evitando riesgos del manipulador y fomentando la aplicación de la regla de las 3R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo).

Los diferentes protocolos de manipulación con los animales, así como eutanasia y sacrificio, fueron previamente autorizados por la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía, y por el Comité Ético de Experimentación Animal del centro de investigación CABIMER.

Los ratones utilizados tienen un fondo genético C57BL/6. La técnica de genotipado para cada línea de ratones se describe en el apartado 1.6 de Materiales y Métodos.

1.2 Líneas de ratones transgénicos *floxeados*

1.2.1 *Gata4^{flox/flox}*

Los ratones *Gata4^{flox/flox}* (*Gata4^{tm1.1Sad/J}*) proceden del laboratorio del Dr. Stephen A. Duncan (*Medical College of Wisconsin*, EE.UU.) y se encuentran disponibles en *Jackson Laboratories*, (Maryland, EE.UU., ref. 8194). Estos ratones tienen un fondo genético híbrido (CD1 x 129S1/SvImJ) y presentan sitios *LoxP* (*locus X-over P1*) en homocigosis que flanquean los exones 3-5 del gen *Gata4* (Watt *et al.*, 2007b).

1.2.2 *Gata6^{flox/flox}*

Los ratones *Gata6^{flox/flox}* (*Gata6^{tm2.1Sad/J}*) se generaron y proceden también del laboratorio del Dr. Stephen A. Duncan (*Medical College of Wisconsin*, EE.UU.) y están disponibles en *Jackson Laboratories* (Maryland, EE.UU., ref. 8196). Los ratones tienen sitios *LoxP* en homocigosis flanqueando el exón 2 del gen *Gata6* (Sodhi, Li and Duncan, 2006).

1.3 Líneas de ratón transgénicos con la recombinasa Cre

1.3.1 *Pdx1-Cre*

En esta tesis se ha utilizado una línea de ratones transgénicos *Pdx1-Cre*, generada por el Dr. Andrew M. Lowy (*University of California San Diego*, EE.UU.) y se obtuvieron del repositorio de *Jackson Laboratories* (Maryland, EE.UU., ref. 14647). Estos ratones *Pdx1-Cre* tienen un fondo genético híbrido (C57BL/6 x FVB/N). En la línea de ratones *Pdx1-Cre*, el gen que codifica para la proteína recombinasa Cre (*Cyclization recombination*) se expresa bajo la regulación de secuencias reguladoras del gen pancreático y duodenal homeobox 1 (*Pdx1*) de ratón (se encuentra a 4,5 Kb aguas arriba del inicio de la transcripción), recapitulando la expresión endógena del gen *Pdx1* tanto en páncreas como en estómago y duodeno. En el páncreas, la expresión de la recombinasa Cre comienza en estadios tempranos del desarrollo pancreático (estadio embrionario E9.5 del desarrollo del ratón) hasta su expresión en estadios adultos en las células β de los

islotes de Langerhans. En el estómago, se recapitula su expresión desde estadios tempranos del desarrollo del *antrum* del estómago y parte proximal del duodeno hasta estadios adultos.

Al cruzar la línea de ratón *Pdx1-Cre* con una línea de ratón transgénico con sitios *LoxP* en homocigosis que flanquean la secuencia de un gen de interés, ésta es escindida, permitiendo así la inactivación del gen de interés exclusivamente en el dominio de expresión de *Pdx1* (Gu, Dubauskaite and Melton, 2002).

1.3.2 *Ptf1a-Cre*

La línea de ratón *Ptf1a-Cre* utilizada en esta tesis fue generada por Roland M. Schmid y Henrik Einwaechter (*Technical University of Munich*) y fue obtenida del repositorio de *Jackson Laboratories* (Maryland, EE.UU., ref. 023329) por el grupo del Dr. Francisco X. Real (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)), con los cuales se mantuvo una colaboración.

Los ratones *Ptf1a-Cre* tienen el gen de la recombinasa Cre insertado dentro del primer exón codificante del gen *Pancreatic Specific Transcription Factor 1a* (*Ptf1a*), dando lugar a un alelo nulo y permitiendo la expresión de *Cre* bajo el control del promotor del gen endógeno *Ptf1a*. La función recombinasa Cre ocurre en el estadio embrionario E10.5 del ratón, en el páncreas (específicamente en el endodermo prepancreático y progenitores, y en las células exocrinas), en el tubo neural, cerebelo y retina.

1.4 Generación de ratones *Gata4* y *Gata6* *knockout* condicionales

Las líneas de ratón *floxeadas* y las líneas de ratón con la recombinasa *Cre* se utilizaron para experimentos de pérdida de función. Utilizando la tecnología *Cre-LoxP* se inactivaron de forma condicional los genes *Gata4* o *Gata6*. Esta tecnología permite la inactivación del gen de interés, que se encuentra flanqueado por las secuencias palindrómicas *LoxP*, mediante la expresión de la recombinasa *Cre*, que reconoce las dos secuencias *LoxP*, produce la recombinación y se escinde la región génica de interés (Fig. 20).

Para obtener la primera generación de ratones *Gata4* knockout condicionales se necesitaron el cruce de dos generaciones. En la primera generación se cruzaron ratones *Gata4*^{flox/flox} con ratones *Pdx1-Cre*, obteniéndose ratones *Gata4*^{flox/+}; *Pdx1-Cre*. En la

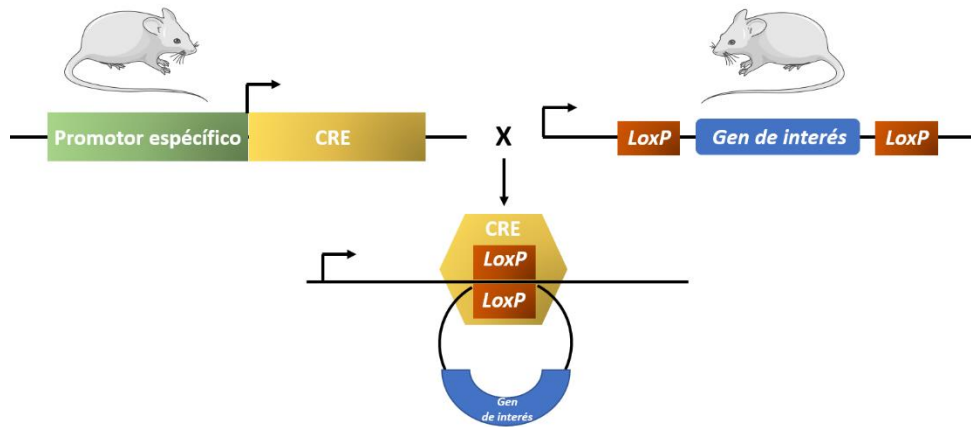


Figura 20. Esquema representativo de la inactivación condicional de un gen mediante la tecnología Cre-LoxP. La recombinasa Cre escinde la región del gen de interés flanqueado por los sitios *LoxP*. La escisión tan solo ocurre en los tejidos donde esté activado el promotor específico que dirige la expresión de Cre.

segunda generación se cruzaron ratones *Gata4*^{flox/+}; *Pdx1-Cre* procedentes del primer cruce con ratones *Gata4*^{flox/flox}. De este cruce, se generaron los ratones mutantes condicionales para el gen *Gata4*, *Gata4*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* (*G4KO*), con una proporción mendeliana del 25%. Dada la viabilidad y fertilidad de los ratones *Gata4*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre*, las siguientes generaciones de ratones *G4KO* fueron generadas cruzando ratones *Gata4*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* con ratones *Gata4*^{flox/flox}, obteniéndose así un 50% de ratones *G4KO*.

Esta misma estrategia se usó para generar los ratones *Gata6*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* (*G6KO*), los ratones *Gata4*^{flox/flox}; *Ptf1a-Cre* y los ratones *DKO* (*Gata4*^{flox/flox}; *Gata6*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre*).

En estos ratones, la escisión de los exones 3, 4 y 5 (*Gata4*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* y *Gata4*^{flox/flox}; *Ptf1a-Cre*) y del exón 2 (*Gata6*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre*), en cada caso, conlleva que las proteínas GATA4 y GATA6 no sean funcionales (Sodhi, Li and Duncan, 2006; Watt *et al.*, 2007b).

1.5 Líneas de ratones con genes reporteros

1.5.1 *Pdx1-LacZ*

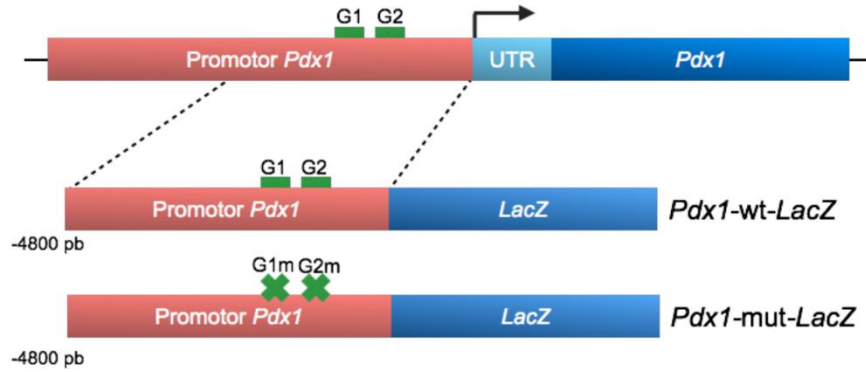


Figura 21. Representación esquemática de las construcciones que portan los ratones *Pdx1-wt-LacZ* y *Pdx1-mut-LacZ*. En el promotor de *Pdx1* se encuentra el área con los dos sitios GATA G1 y G2, fusionado al gen *LacZ* en los ratones *Pdx1-wt-LacZ*. En los ratones *Pdx1-mut-LacZ* aparece el mismo fragmento del promotor de *Pdx1* con la versión mutada de los sitios GATA, G1m y G2m. Imagen extraída de la tesis doctoral del Dr. Manuel Carrasco, 2012.

En esta tesis se utilizaron los páncreas ya incluidos en bloques de parafina de los ratones transgénicos *Pdx1-wt-LacZ* y *Pdx1-mut-LacZ* previamente descritos en Carrasco et al., 2012, de 11 semanas y 6 meses de edad. Estos ratones tienen fusionado el gen *LacZ* bajo el control del promotor del gen *Pdx1*. Este fragmento del promotor contiene dos sitios de unión para los factores GATA, llamados G1 y G2. Los ratones *Pdx1-mut-LacZ*

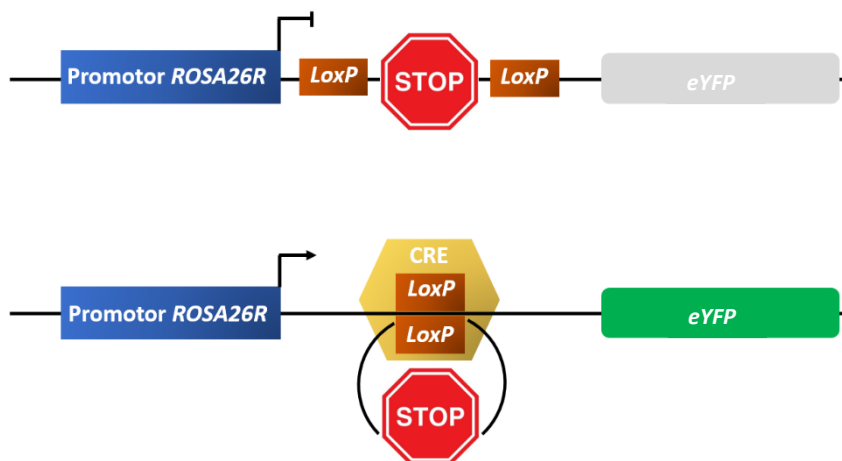


Figura 22. Representación esquemática del transgén *ROSA26R* acoplado al sistema reportero *eYFP*. Los codones de STOP flanqueados por los sitios *LoxP* bloquean la expresión del gen reportero *eYFP*. Al escindir los codones de STOP mediante la recombinasa Cre se permite la expresión del gen reportero.

contienen una mutación en ambos sitios G1 y G2 que impiden la unión de factores GATA (Fig. 21) (Carrasco *et al.*, 2012). Ambas líneas transgénicas fueron generadas en el Servicio General de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla (Espartinas, Sevilla).

1.5.2 Rosa26R-eYFP

Los ratones *Rosa26R-eYFP* utilizados en esta tesis fueron generados por Frank Costantini (*Columbia University Medical Center*) y se obtuvieron del repositorio de *Jackson Laboratories* (Maryland, EEUU, ref. 006148). Estos ratones tienen una secuencia de STOP flanqueada por los sitios *LoxP* seguido del gen reportero *YFP* (*Yellow Fluorescent Protein*) insertado dentro del locus *Gt(ROSA)26Sor* (Soriano, 1999). Al cruzar estos ratones con una línea de ratones que porten la recombinasa Cre, mediante la acción de ésta la secuencia STOP comprendida entre los sitios *LoxP* es escindida y se permite la expresión del gen *eYFP* en aquellos tejidos donde actúe la recombinasa (Fig. 22).

Esta línea de ratón fue utilizada para cruzarla con los ratones de la línea *Gata4^{flox/flox}* (*Gata4^{flox/flox}; eYFP/eYFP*) y posteriormente con la línea de ratones *Pdx1-Cre*, obteniendo los ratones *Gata4^{flox/flox}; eYFP/eYFP; Pdx1-Cre* (*G4-eYFP-KO*), pudiendo observar marcaje *YFP* en los tejidos donde se expresa *Pdx1*. Como control se utilizaron los ratones *eYFP/eYFP; Pdx1-Cre* (*eYFP-Pdx1-Cre*).

1.6 Genotipado de ratones

1.6.1 Extracción de ADN genómico

El ADN para el genotipado de los ratones se extrajo del tejido de la cola del ratón o del saco embrionario y amnios, en el caso de embriones. Siguiendo un protocolo previamente descrito (Dodou, Xu and Black, 2003), los tejidos de cola de ratón o de sacos embrionarios se digirieron con 400 µl de tampón de lisis (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, SDS 1%, Tris-HCl 10 mM) y 20 µl de proteinasa K (200 mg/mL, pH 8.0) incubándolos a 65

°C en agitación hasta que se disgregue. Posteriormente las muestras de los tejidos digeridos fueron tratados según el siguiente protocolo:

1. Añadir 300 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (0883, Amresco) y vortear.
2. Centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad.
3. Recoger la fase superior (acuosa) sin apurar y añadir 900 µL de etanol 100% (1.00983.1000, Emsure) a 4°C.
4. Dejar precipitar el ADN durante 10 minutos a -20°C.
5. Centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.
6. Resuspender el *pellet* en 75 µL de agua miliQ.

1.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para genotipar las diferentes líneas de ratón, a partir del ADN genómico extraído, se utilizó la técnica de PCR (Saiki *et al.*, 1988). La PCR es una técnica que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable, llamada Taq Polimerasa. En este caso se utilizó el kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (M8305, Promega) con el siguiente protocolo:

Componente	Volumen (µL)
5X Green GoTaq Flexi Buffer	4
dNTPs (2 mM) (Bioline, BIO-39025)	1
Oligonucleótido directo (25 ng/µL)	1
Oligonucleótido reverso (25 ng/µL)	1
MgCl ₂ (25 mM)	1
GoTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,2
ADN	1
Agua libre de ARN	Hasta 20

El programa de reacción utilizado en el termociclador para genotipar los ratones *Gata6*^{flox/flox}, *Pdx1-Cre* y *ROSA26R-eYFP* fue el siguiente:

Paso	T °C	Tiempo	Anotación
1	95	4 min	-
2	95	45 s	-
3	55	45 s	-
4	72	45 s	-
5	-	-	Repetir pasos 2-4, 35 ciclos
6	72	5 min	-
7	4	∞	-

Y el programa utilizado para genotipar los ratones *Gata4*^{flox/flox} fue:

Paso	T °C	Tiempo	Anotación
1	94	2 min	-
2	94	20 s	-
3	65	15 s	Disminuir 0,5 °C por ciclo
4	68	10 s	-
5	-	-	Repetir pasos 2-4, 10 ciclos
6	94	15 s	-
7	60	15 s	-
8	72	10 s	-
9	-	-	Repetir pasos 6-8, 28 ciclos
10	72	2	-
11	10	∞	-

En la siguiente tabla se indican los oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) utilizados para el genotipado de cada línea de ratón:

Línea de ratón	Oligonucleótidos directo y reverso (5'-3')
<i>Pdx1 – Cre</i> y <i>Ptf1a-Cre</i>	D: ACGACCAAGTGACAGC R: CCAGGTTACGGATATAGTTCATG
<i>Gata4</i>^{flox/flox}	D: CCCAGTAAAGAAGTCAGCACAAGGAAAC R: AGACTATTGATCCCGGAGTGAACATT
<i>Gata6</i>^{flox/flox}	D: GTGGTTGTAAGGCGGTTTGT R: ACGCGAGCTCCAGAAAAAGT
<i>Rosa26R – eYFP</i>	Alelo mutante: AAGACCGCGAAGAGTTGTC Alelo común: AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT Alelo silvestre: GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Los productos de PCR se cargaron en geles TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2mM, pH 7,7) de agarosa al 2% con RedSafe 20.000X (21141, Labotag), que emite fluorescencia verde al unirse al ADN. Se separaron por electroforesis (90-120 V) durante 30 minutos y el resultado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Universal Hood II, BIORAD). Como referencia para identificar el tamaño de cada banda de ADN se utilizó un marcador de peso molecular (GTP-BM0004, gTPbio).

2. Líneas celulares

2.1 HEK293T

La línea celular HEK293T (o 293T) procede de células embrionarias humanas de riñón. Esta línea deriva de la línea celular HEK293 y expresa una versión mutante del antígeno T SV40 grande. Esta línea celular fue utilizada para la amplificación de adenovirus. Se cultivaron en medio completo DMEM (D5796, Sigma-Aldrich), suplementado con 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S) (15140, Gibco), 1% de Glutamina 2 mM (25030, Gibco) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (F7524, Sigma-Aldrich). Crecieron en placas de 10 cm² (150350, ThermoFisher) en un incubador a 37 °C al 5% de CO₂. El pase de las células se realizó cuando alcanzaron una confluencia del 80%. Para realizar el pase, previamente las células se lavaron con 5 mL de PBS 1X y se incubaron con 1 mL de Tripsina-EDTA (25200, Gibco) durante 5 minutos en el incubador a 37 °C para romper la adherencia la placa de cultivo. Al cabo de este tiempo, la tripsina se neutralizó con 9 mL de medio completo DMEM, y se recogieron las células y se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendió en medio completo DMEM y se procedió al subcultivo sembrando 1/10 del volumen celular.

Para la conservación de la línea celular, se congelaron 1x10⁶ células en crioviales (contadas con la ayuda de la cámara de Neubauer) resuspendidas en FBS con 10% de DMSO (D4540, Sigma-Aldrich). Los crioviales se congelaron primeramente a -80 °C en un contenedor con isopropanol. Posteriormente se conservaron en un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

2.1.1 Amplificación de adenovirus

En esta tesis doctoral se utilizaron dos tipos de adenovirus, el Adenovirus-Cre para la expresión de la recombinasa Cre (Ad-Cre) (SL100707, SignaGen) y el Adenovirus-GFP que expresa la proteína GFP y fue usado como control (Ad-GFP) (093375A, Europe-Gentaur Molecular Products bvba). Para la amplificación de los adenovirus se utilizó la línea celular HEK293T. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas de la siembra, las células al 60-70% de confluencia se infectaron con 70 μ l de adenovirus (stock P0). Tras 48 horas post-infección en el incubador a 37 °C y 5 % de CO₂, el sobrenadante y las células se recogieron y se congelaron a -80 °C.

Posteriormente, las células se descongelaron (baño de agua a 37 °C) y congelaron (-80 °C) tres veces consecutivas. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante (stock P1). Para una segunda amplificación se usaron placas de 10 cm² con células HEK293T a una confluencia del 60% y se infectaron con 200 μ l del stock P1 de adenovirus. Al cabo de 1 hora de incubación en el incubador a 37 °C, se añadieron 5 mL de medio DMEM completo. Tras 48 horas de infección, las células perdieron su adherencia a la placa y se recogieron y congelaron a -80 °C. Posteriormente se descongelaron y congelaron 3 veces y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se alicuotó (stock P2) y se guardó a -80 °C hasta su uso.

2.1.2 Titulación de adenovirus

A partir del stock P2, se procedió a la titulación de ambos adenovirus mediante el kit AdEasy Viral Titer (972500, Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Partiendo de un stock a 1×10^6 *Infectious Unit* (IFU)/mL, después de la amplificación la titulación de Ad-Cre fue 3×10^8 IFU/mL y $3,2 \times 10^8$ IFU/mL de Ad-GFP.

2.2 AGS

La línea celular AGS procede de células de adenocarcinoma gástrico humanas (CRL-1739, ATCC). Esta línea celular se cultivó en el mismo medio de cultivo descrito en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos.

3. Aislamiento de islotes de Langerhans

3.1 Aislamiento de islotes pancreáticos humanos

Los islotes pancreáticos humanos fueron proporcionados por el Centro de Aislamiento Celular y Trasplante (Ginebra, Suiza) y recepcionados por el laboratorio del Dr. Benoit Gauthier (CABIMER), con el que mantuvimos una colaboración.

3.2 Aislamiento de islotes pancreáticos de ratón

Para el aislamiento de los islotes pancreáticos los ratones *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO* se sacrificaron por dislocación cervical, se canularon por el colédoco y se inyectó una solución 0,7 mg/ml de colagenasa tipo V fría (C9263, Sigma-Aldrich) con el fin de perfundir y digerir el páncreas. Tras extraer el páncreas, se incubó durante 10 minutos a 37 °C en un baño de agua y se disgregó de forma manual mediante agitación. Posteriormente, los islotes en suspensión se recogieron manualmente mediante una micropipeta y se pusieron en PBS 1X (Szot, Koudria and Bluestone, 2008).

4. Obtención, procesamiento y montaje de tejidos

4.1 Obtención de tejido pancreático de ratones

El sacrificio de los ratones para la obtención de órganos y tejidos se realizó mediante dislocación cervical. El resto de los tejidos fueron desechados siguiendo la reglamentación del Comité de Ético del CABIMER.

El tejido pancreático se obtuvo de los ratones adultos (machos y hembras) *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO* a diferentes edades: 1 día, 2, 4, 6, 12 meses. Tras el sacrificio del ratón, se limpió el abdomen con alcohol al 70% y se abrió la cavidad abdominal para la extracción del páncreas. Éste fue lavado con PBS 1X a 4 °C varias veces. El procesamiento de los páncreas para el posterior análisis histológico se explica en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos.

Para obtener tejido pancreático embrionario de ratón se obtuvieron embriones de cruces de las líneas de *Gata4^{flox/flox}* X *Gata4^{flox/flox}*; *Pdx1-Cre*. Las hembras se revisaron

diariamente desde el primer día de cruce con los machos para la detección del tapón vaginal. El día de la aparición del tapón vaginal se consideró el estadio E0.5 de gestación, ya que se forma durante la noche anterior. Las hembras preñadas se sacrificaron a E13.5, se extrajeron los embriones y se limpiaron en PBS 1X a 4 °C. Se reservó el saco embrionario de cada embrión para su posterior genotipado. Los embriones se diseccionaron para obtener el páncreas dorsal embrionario para extracción de ARNm y posterior análisis mediante qPCR o se incluyeron para análisis histológicos. El procesamiento de los páncreas para el posterior análisis histológico se explica en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos.

4.2 Obtención de tejido gástrico de ratones

El tejido gástrico se obtuvo de los ratones *Gata4*^{flox/flox}, *G4KO*, *Gata6*^{flox/flox} y *G6KO* a diferentes edades: E13.5, E15.5, E17.5, 1 día (P1) y adultos, y de los ratones *DKO* (*Gata4*^{flox/flox}; *Gata4*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre*) y *Gata4*^{flox/flox}; *Ptf1a-Cre* a P1. El tejido gástrico a estadios embrionarios se obtuvo como se describe en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. Tras el sacrificio de los ratones, se abrió la cavidad abdominal para la extracción del estómago. Se vació del contenido gástrico del estómago y fue lavado con PBS 1X a 4 °C varias veces. El procesamiento del estómago para el posterior análisis histológico, inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia se explica en el apartado 4.4 de Materiales y métodos.

4.3 Obtención de biopsias gástricas y pancreáticas humanas

Las muestras histológicas humanas de tejido pancreático y de tejido gástrico proceden del biobanco del Hospital Virgen del Rocío (HUVR-IBIS, Sevilla). Las biopsias gástricas se obtuvieron con el consentimiento informado de cada paciente. El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) y el estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Se utilizaron secciones histológicas de 24 pacientes. Todas las muestras analizadas contenían tejido pancreático ubicado en la capa subserosa del estómago. De las 24 muestras, 18 de ellas contenían estómago glandular.

4.4 Fijación, procesamiento y montaje de tejidos

Todos los tejidos adultos o embrionarios se lavaron con PBS 1X y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% (PFA 4%; P6148-500G, Sigma-Aldrich) en PBS 1X durante toda la noche a 4°C. El volumen de PFA al 4% cubría el tejido a fijar. En el caso de los páncreas adultos, la fijación se realizó en movimientos de rotación en la noria en la cámara de 4 °C. Tras la fijación, los tejidos se lavaron con PBS 1X para eliminar los restos de PFA y se conservaron a 4°C. Una vez fijados, los tejidos se trataron para incluirlos en parafina tras un proceso de deshidratación pasando por una serie de concentraciones crecientes de etanol y de pasos por xileno (28975.360, AnalaR NORMAPURE) y finalmente por parafina (1116092504, Merck-Millipore). Para ello se utilizó el procesador de tejidos automático Leica TP 1020, con el siguiente programa:

Nº cubeta	Contenido	Tiempo (h)
2	PBS 1X	6
3	Alcohol 70 °	1
4	Alcohol 80 °	1
5	Alcohol 96 °	1
6	Alcohol 96 °	1
7	Alcohol 100 °/Absoluto	1
8	Alcohol 100 °/Absoluto	1
9	Xileno	1
10	Xileno	1
11	Parafina	1
12	Parafina	1

Una vez deshidratados, los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina en la estación de inclusión en parafina (Leica EG 1150 H) y los bloques se conservaron a 4 °C.

4.5 Corte de tejidos en microtomo

Los tejidos incluidos en bloques de parafina se cortaron en secciones de 6 µm en un microtomo Leica DM6000B. Se colocaron dos cortes por portaobjetos Superfrost Plus (631-0108, VWR).

5. Tinciones con hematoxilina y eosina

Los cortes de tejidos de desparafinaron y se rehidrataron para poder ser teñidos con hematoxilina y eosina siguiendo el protocolo que aparece a continuación. Las tinciones se realizaron en cubetas de cristal y se utilizó: hematoxilina de Gill III (1.05174.0500, Merk), alcohol ácido (1% HCl, 29% H₂O destilada, 70% etanol) y eosina Y acuosa al 1% (05-10002/L, Bio-Optica).

Primeramente, se desparafinaron e hidrataron los cortes:

Cubeta	Contenido	Tiempo (min)
1	Xileno I	8
2	Xileno II	8
3	Alcohol 100%	5
4	Alcohol 100%	5
5	Alcohol 90%	3
6	Alcohol 70%	3
7	Agua del grifo	5

Los tiempos de tinción variaron teniendo en cuenta si eran tejidos embrionarios o adultos:

1. Hematoxilina 2,5 min (tejido embrionario) o 4 min (tejido adulto)
2. Agua del grifo
3. Lavar en la cubeta con del grifo
4. Alcohol ácido 1% 10 segundos (tejido embrionario) o 10 inmersiones (tejido adulto)
5. Agua del grifo
6. Lavar en la cubeta con agua del grifo
7. Eosina 2 min o 1,5 min
8. Agua del grifo
9. Lavar en la cubeta con agua del grifo

Una vez finalizada la tinción, los cortes histológicos se deshidrataron pasándolas por la misma batería de alcoholes descrita arriba en dirección etanol 70% hasta el xileno. Cada pase por las distintas cubetas fue de un minuto de duración. Tras finalizar la deshidratación, las muestras se montaron con un par de gotas de medio de montaje para microscopia DPX (255254.1610, PanReac AppliChem) y se les colocó un cubreobjetos (15747592, Menzel-Gläser, Thermo).

6. Técnicas de inmunodetección

6.1 Inmunofluorescencia

6.1.1 Inmunofluorescencia en cortes histológicos

Para la inmunodetección de distintos antígenos en las secciones de parafina se llevaron a cabo técnicas de inmunofluorescencia (IF).

Los cortes histológicos fueron desparafinados y rehidratados como se explica en el apartado 5 de Materiales y Métodos. A continuación, se procedió a la exposición de los epítomos sumergiendo los portaobjetos con los cortes en tampón citrato 10 mM pH 6 a 121 °C durante 40 minutos. Para ello, se utilizó una autoclave de sobremesa (4001745, Selecta). En algunas ocasiones, el anticuerpo primario utilizado requiere utilizar un método alternativo al autoclave. En ese caso, como ocurre con el anticuerpo para glucagón (G2654, Sigma-Aldrich) se utilizó el microondas con los siguientes tiempos: 3 minutos en el microondas sin llegar a ebullición y 2 minutos dejando enfriar a temperatura ambiente, repitiendo estos pasos 3 veces.

Tras sacar las muestras del autoclave o del microondas se dejaron enfriar los tejidos y se lavaron con PBS 1X. A partir de este punto se procedió con el siguiente protocolo:

1. Incubación y bloqueo de las muestras en cámaras de incubación (70324-20, Electron Microscopy Sciences) con la solución PBST 0,2 % (Tween 20, A4974.0100, PanReac AppliChem) + albúmina de suero bovino (BSA, A3294, Sigma) al 3% como bloqueo durante 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

2. Incubación con el anticuerpo primario diluido en PBST 0,2% + BSA 3% a la concentración adecuada de cada anticuerpo en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche.
3. Lavar los portaobjetos con los tejidos con PBS 1X.
4. Incubación con anticuerpo secundario portador del fluoróforo diluido en PBST 0,2 % + BSA 3% a concentración 1:300 en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora.
5. Lavar los portaobjetos con los tejidos con PBS 1X.
6. Tinción de los núcleos con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole -32670; Sigma Aldrich) a concentración 1:1000 en PBST durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar los portaobjetos con los tejidos con PBS 1X.
8. Los tejidos se montan con medio de montaje para fluorescencia (S3023, Dako).
9. Las muestras se conservan en cámara húmeda a 4 °C para su posterior toma de imágenes en el microscopio.

Las técnicas de inmunofluorescencia fueron útiles para diferentes fines concretos además de la detección y visualización de proteínas específicas en los tejidos.

6.1.2 Inmunofluorescencia en líneas celulares

Se utilizó la técnica de Inmunofluorescencia para la inmunodetección de expresión de diferentes marcadores en las células AGS tras ser transfectadas, como se indica posteriormente en el apartado 11.1.1 de Materiales y Métodos. El protocolo de inmunocitoquímica seguido fue el siguiente:

1. Limpiar los pocillos con las células con PBS 1X.
2. Fijación y permeabilización de las células con 200 µL/pocillo de metanol (20847.307, VWR) a -20 °C durante 10 minutos.
3. Limpiar las células tres veces, durante 5 minutos cada una, con PBS 1X.

4. Incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con 200 μ L/pocillo de PBST 0,2 % + BSA al 2%, como bloqueo.
5. Incubación con 200 μ L/pocillo de anticuerpo primario, diluido a la concentración adecuada, en PBST + BSA 2%, durante toda la noche a 4 °C, sellando la placa con Parafilm (PM-996, Bemis).
6. Limpiar los pocillos con PBS 1X.
7. Incubación con 200 μ L/pocillo de anticuerpo secundario, diluido a concentración 1:300 en PBST, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Limpiar las células tres veces, durante 5 minutos cada una, con PBST.
9. Incubar durante 5 minutos con 200 μ L/pocillo de la solución DAPI diluido 1:1000 en PBST.
10. Limpiar de nuevo las células tres veces, durante 5 minutos cada una, con PBST.
11. Limpiar las células durante 5 minutos con PBS 1X.
12. Las lamelas son montadas en portaobjetos (Superfrost plus, J1800AMN2, Thermo) poniendo en contacto las células con una gota de medio de montaje para fluorescencia Dako (S3023, Dako) con la ayuda de una aguja y pinza para poder levantar y montar las lamelas.
13. Mantener las muestras montadas en cámara húmeda a 4 °C.

6.2 Inmunohistoquímica

En la técnica de inmunohistoquímica (IHC) el anticuerpo secundario está acoplado a una enzima, generalmente, la peroxidasa del rábano (*horseradish peroxidase*, HRP). Cuando la peroxidasa entra en contacto con el reactivo DAB, se genera un complejo no soluble que precipita.

En las IHC los tejidos tras ser enfriados al sacarlos de la autoclave se incubaron con una solución al 5% de H₂O₂, diluido en agua miliQ, durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Este paso es esencial para inactivar la peroxidasa endógena.

Los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran conjugados con biotina. Tras incubar durante 1 hora con el anticuerpo secundario biotinilado y limpiar con PBS 1X, se procede a incubar las muestras durante 1 hora con el kit *Vectastain Elite ABC* (PK-6100, Vector Laboratories) para la amplificación de la señal a través de las interacciones biotina-estreptavidina. Posteriormente, se limpian las muestras nuevamente con PBS 1X y se revelan con el kit *DAB Substrate* (3,3'-diaminobenzidine, SK-4100, Vector Lab) bajo el microscopio (Nikon Eclipse E200) hasta que se observa señal. Para parar la reacción las muestras se sumergen en PBS 1X. Por último, los tejidos se deshidratan, como se ha explicado anteriormente, en la batería de etanol y xileno y se montan con medio DPX (360294H, VWR BDH Prolabo) cubriendo las muestras con cubreobjetos.

6.3 Amplificación de la señal de fluorescencia

En el caso de las IF con los anticuerpos para NKX2.2 y NKX6.1 en los tejidos pancreáticos, se utilizó un paso de amplificación con el kit *TSA Fluorescein System* (NEL701A001KT, Perkin Elmer), siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.4 Lista de anticuerpos

En la siguiente tabla se detallan los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis, la especie de origen donde se han producido, la dilución utilizada y la compañía comercial.

Fuente	Anticuerpo	Dilución	Compañía
ratón	anti-amilasa	1:200	Santa Cruz, Sc-46657
ratón	anti-e-cadherina	1:100	BD Bioscience, 610181
ratón	anti-GATA4	IHC 1:100 ICC 1:300	Santa Cruz, 25310
cabra	anti-GATA6	1:1000	R&D Systems
conejo	anti-GATA6	1:50	Santa Cruz, Sc-9055
cabra	anti-GFP	1:200	Abcam, ab6673
conejo	anti-ghrelina	1:50	Abcam, ab209790
ratón	anti-glucagón	1:100	Sigma-Aldrich, G2654

conejo	anti-Glut2	1:300	Millipore, 07-1402
ratón	anti-HK ⁺ /ATPasa	1:1000	Abcam, ab2866
conejo	anti-Hnf1b	1:100	Santa Cruz, sc-8986
rata	anti-iNOS	1:100	Thermo Fisher Scientific, PA1-036
ratón	anti-Insulina	1:500	Sigma-Aldrich, I2018
conejo	anti-Ki67	1:100	Labvision, RM9106
conejo	anti-citoqueratina14	1:100	Abcam, ab15461
conejo	anti-MafA	1:50	Bethyl Laboratories, IHC-00352
hamster	anti-mucina1	1:200	Abcam, ab80952
ratón	anti-muc5ac	1:200	Thermo scientific, MS-145-P
ratón	anti-Ngn3	1:200	DSHB, F25A1B3
ratón	anti-Nkx2.2	1:25	DSHB, 74.5A5
ratón	anti-Nkx6.1	1:50	DSHB, F55A10
ratón	anti-péptido C	1:100	Millipore, 05-1109
cobaya	anti-Pdx1	1:200	Abcam, ab7308
ratón	anti-Pdx1	1:200	Abcam, ab47308
conejo	anti- PP	1:100	Millipore, ab939
conejo	anti-Ptf1a	1:2000	Beta Cell Biology Consortium, AB2153
conejo	anti- α -actina del músculo liso	1:100	Abcam, Ab5694
ratón	anti- α -actina del músculo liso	1:300	Sigma-Aldrich, A5228
cabra	anti-somatostatina	1:1000	Santa Cruz, sc-7819
conejo	anti-Sox2	1:300	Chemicon International, ab5603
conejo	anti-Sox9	1:800	Millipore, AB5535
conejo	anti- β -galactosidasa	1:500	MP Biochemicals, 559762
-	DBA	1:300	Vector laboratories, B.1035

7. Captura de imágenes

Para la toma de imágenes fueron utilizados diferentes equipos de la Unidad de Microscopía de CABIMER.

7.1 Microscopía vertical de fluorescencia Leica AF6000

Utilizado para visualizar muestras de cortes histológicos y de células, con luz transmitida (campo claro) en el caso de los tejidos, y con fluorescencia en ambos casos, con una lámpara halógena EL6000 de Leica. Para la adquisición de las imágenes de las muestras de fluorescencia se utilizó la cámara Leica DFC350 FX, y el programa *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF).

Para la toma de imágenes de las inmunohistoquímicas y tinciones con H&E se utilizó la cámara Leica DFC500, y el programa *Leica Application Suite* (LAS).

7.2 Microscopía automática de fluorescencia Nikon NiE-eclipse

Utilizado para la obtención de imágenes del corte histológico completo de tejido gástrico y pancreáticos de ratón. El microscopio Nikon está diseñado para la composición de una imagen a partir de imágenes de menor tamaño. De esta forma, se consigue mostrar en una sola imagen un tejido completo de gran superficie con alta magnificación y resolución. La adquisición de imágenes de fluorescencia se realizó con la cámara Hamamatsu 1360, a través del programa Nis-Elements.

7.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Utilizado para el análisis de los islotes aislados de los ratones *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO*, procesados según el protocolo estándar de Spurr (Spurr, 1969). Las imágenes en el MET fueron tomadas con una cámara EMCDD (TRS 2k 3 2k) por un técnico especializado del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

8. Cuantificación de transcritos de ARN mensajero por PCR cuantitativa

8.1 Extracción de ARN total

Se extrajo ARN total de islotes aislados de ratón y humanos, de la línea celular AGS y del tejido del páncreas dorsal embrionario a E13.5. Para la extracción de ARN total de las células AGS se cultivaron 200.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (140675, Thermo) y cada muestra estaba formada por dos pocillos (400.000 células). En el caso de los islotes aislados de ratones, para la obtención de una muestra se juntaron 300 islotes procedentes de 3 ratones. En el caso de los islotes humanos, cada muestra procedía de 300 islotes. Y para la obtención de una muestra procedente de tejido de páncreas dorsal se juntaron 5 tejidos.

Durante todo el procedimiento de extracción se utilizó material estéril y se trató el material y las superficies con RNase-ExitusPlus (A7153, PanReac Applichem) para evitar la degradación del ARN de las muestras. En el caso de las células AGS, se recogieron las células mediante raspado con *scraper* (353085, Falcon). Las células y los islotes aislados en cultivos se recogieron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos. El *pellet* de células o de islotes, y el tejido de páncreas dorsal embrionario fueron resuspendidos en cada caso en 350 µL de Buffer RLT con 0,01% de 2-mercaptoetanol (M6250, Sigma-Aldrich) y se lisaron las células pasándolas 5 veces través de una aguja de 25 G y 5 veces por una aguja 30 G. El ARN se extrajo con el kit *RNeasy Plus micro kit* (74034, Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad de ARN se midió en el Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo) y las muestras se conservaron a -80 °C hasta su posterior uso.

8.2 Reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR)

Las muestras de ARN total extraído se utilizaron para obtener ADN complementario (ADNc) mediante la reacción de transcriptasa reversa con el kit sistema *Quantitect Reverse Transcription Kit* (205311, Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron 1000 ng de ARN purificado por reacción. Posteriormente las muestras se conservaron a -20 °C.

8.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR)

Las muestras fueron utilizadas para cuantificar los transcritos de ARN por PCR cuantitativa (qPCR) empleando dos kits diferentes: SYBR TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase Plus) (RR420A, Takara) y Taqman Gene Expression Master Mix (4369016, Applied Biosystems). Con el kit de SYBR, cada reacción contenía 12,5 µL de SYBR (300 nM), 3,75 µL de cada oligonucleótido (1 µM) y 50 ng de ADN. La reacción fue llevada a un volumen final de 25 µL con agua miliQ. Con el kit de Taqman cada reacción contenía 10 µL de buffer Taqman, 1 µL de sonda Taqman y 50 ng de ADN. La reacción fue llevada a un volumen final de 20 µL con agua miliQ.

Cada muestra fue analizada por triplicado y los resultados fueron normalizados con respecto la expresión de un gen endógeno; GAPDH para cuantificación mediante SYBR Green y β -actina para cuantificación mediante sondas Taqman. Para el cálculo de los cambios de expresión génica se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001).

8.4 Lista de oligonucleótidos y sondas Taqman

Las sondas Taqman y oligonucleótidos utilizados para qPCR en esta tesis se muestran en las siguientes tablas:

Gen	Especie	Referencia sonda Taqman
Abcc8	ratón	Mm00803450_m1
Actb	humano	Hs03023880_g1
Actb	ratón	Mm02619580_g1
Cacna1c	ratón	Mm01188822_m1
Gata4	humano	Hs00171403_m1
Gata4	ratón	Mm00484689_m1
Gata6	ratón	Mm00802632_m1
Gcg	ratón	Mm00801714_m1
Hes1	ratón	Mm01342805_m1
Ins1	ratón	Mm01950294_s1
Ins2	ratón	Mm00731595_gH
Irs2	ratón	Mm03038438_m1
Krt14	humano	Hs00265033_m1
Ngn3	ratón	Mm00437606_s1
Nos2	ratón	Mm0040502_m1
Nkx2.2	ratón	Mm03053916_s1
Nkx6.1	ratón	Mm00454961_m1
Pcsk1	ratón	Mm00479023_m1
Pdx1	ratón	Mm00435565_m1
Scl2a2	ratón	Mm00446224_m1
Sst	ratón	Mm00436671_m1

Oligo	Directo	Reverso
MafA	5'-GAGGAGGTCATCCGACTGAAA-3'	5'-GCACTTCTCGCTCTCCAGAAT-3'
Snap25	5'-GAGAACCTGGAGCAGGTGAG-3'	5'-AGCATCTTTGTTGCACGTTG-3'
β-actina	5'-TCCTGTGGCATCCACGAACTACA-3'	5'-ACCAGACAGCACTGTGTTGGCATA-3'

9. Microarray

Los islotes aislados procedentes de tres ratones *Gata6*^{flox/flox} o de tres ratones *G6KO* fueron recolectados para extraer una muestra de ARN total. La extracción de ARN total

se realizó siguiendo lo indicado en el apartado 8.1 de Materiales y métodos. Se realizó el perfil genético de tres muestras independientes de ratones control y de cuatro muestras independientes de ratones *G6KO* mediante *Affymetrix GeneChip Mouse Gene 2.0 ST Array*, llevado a cabo en la Unidad de Genómica de CABIMER.

La concentración de ARN utilizado por muestra fue de 250 ng/μl, resuspendido en agua libre de RNAsas. Las muestras de ARN fueron entonces procesadas en la Unidad de Genómica de CABIMER donde se comprobó la calidad de las muestras de ARN total mediante el *Bioanalyzer* (Agilent 2100) y se sintetizó, amplificó, purificó y marcó con biotina el ADNc correspondiente de las muestras siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Posteriormente se realizó la hibridación de los *arrays* y se hizo la lectura de la señal con el Scanner 3000 7G de *Affymetrix*®.

Los resultados obtenidos de este análisis de *Affymetrix* fueron analizados mediante análisis bioestadísticos. Los genes expresados diferencialmente se definieron como aquellos para los cuales el valor *P* fue menor o igual a 0,05. Los datos de expresión génica están disponibles en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (número de acceso GSE106316) (Barrett *et al.*, 2013). La qPCR para la validación de aquellos genes de interés cuya expresión aparecieron diferenciadas en el análisis de *microarray* se realizaron a partir de al menos siete muestras independientes de ARN total extraído de islotes de ratones control e islotes de ratones *G6KO*. La qPCR se realizó como se indica en el apartado 8.3 de Materiales y métodos.

10. Ensayos *in vivo*

10.1 Test de tolerancia a la glucosa (GTT)

Los ratones machos y hembras *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO* de diferentes edades (2, 4, 6 y 12 meses) fueron privados de comida durante 15 horas. Se utilizaron 18 individuos machos y 12 individuos hembra por genotipo y condición experimental. A primera hora de la mañana, los ratones fueron pesados y se midieron los niveles de glucosa basales en ayuno. Para las medidas se les realizó una pequeña incisión en la punta de la cola y se les extrajo una gota de sangre. Se midió los niveles de glucosa con el glucómetro Accu-Check Aviva Plus y con las tiras reactivas compatibles (05987431, Accu-Check). Tras

conocer el valor basal de glucosa a los ratones se les inyectó de forma intraperitoneal una solución filtrada de 2 g/kg de peso corporal, de D-glucosa (G8270, Sigma-Aldrich) disuelta en PBS 1X estéril. La glucemia se midió a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la administración de la glucosa.

Tras representar gráficamente los valores de glucosa en sangre, se procedió a calcular el área bajo la curva (ABC) de glucemia de cada genotipo y condición experimental. Para ello se utilizó el programa SigmaPlot.

10.2 Niveles de insulina en plasma

Se midieron los niveles de insulina *in vivo* en plasma de 10 ratones *Gata6^{flox/flox}* y 10 ratones *G6KO* machos de 6 meses de edad. Para ello, se recogió la sangre a tiempo 0 y, 5 y 30 minutos tras la inyección intraperitoneal de glucosa, como se indica en el apartado 10.1. La sangre fue recogida en tubos con EDTA (Microvette CB 300 K2E, 16.444, Sarstedt AG&Co) y se centrifugaron a 4 °C para obtener la fracción de plasma. La concentración de insulina en plasma se midió con el kit *Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA* (90020, Crystal Chem), siguiendo las indicaciones del fabricante.

10.3 Niveles de insulina, proinsulina y péptido C en plasma

Se midieron los niveles de insulina, proinsulina y péptido C *in vivo* en plasma de ratones en ayuno *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO* machos de 2 y 6 meses de edad, de 11 individuos por genotipo y condición experimental. Se recogió la sangre de la cola en ayunas, como se indica en el apartado 10.1, en tubos con EDTA y se centrifugaron a 4 °C para obtener la fracción de plasma. Para medir los diferentes niveles se utilizaron los kits *Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA*, *Mouse C-Peptide ELISA* (90050, Crystal Chem) y *Mouse Proinsulin ELISA* (10-1232-01, Mercodia), siguiendo las indicaciones del fabricante. Con los valores de insulina y proinsulina circulante en plasma se calculó la ratio proinsulina/insulina de los ratones *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO* a los 2 y 6 meses de edad.

10.4 Medida de la actividad amilasa en plasma

Se midieron los niveles de actividad amilasa *in vivo* en plasma de ratones *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO* machos de 2 y 6 meses de edad, de 11 individuos por genotipo y condición experimental. Se recogió la sangre de la cola, como se indica en el apartado 10.1, en tubos con EDTA y se centrifugaron a 4 °C para obtener la fracción de plasma. Para medir la actividad amilasa se utilizó el kit *Amylase Assay* (ab102523, Abcam) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se midió la actividad cinética de la amilasa durante 30 minutos utilizando un espectofotómetro (Varioskan, Thermo) para la lectura de microplacas.

11. Ensayos *in vitro*

11.1 Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)

11.1.1 siRNA GATA4

Para estos experimentos se cultivaron 40.000 células AGS/pocillo en placas de 24 pocillos (142475, Thermo) con lamelas (631-0713, Menzel Gläser) gelatinizadas al 0,2 % (G1890, Sigma). La línea celular AGS fue transfectada dos veces con el siRNA GATA4 (14463, ON-TARGETplus SMARTpool, Mouse GATA4 5nmol, Thermo) o con el Stealth RNAi™ siRNA (12935300, ThermoFisher), como control. Para ello se utilizó la lipofectamina RNAiMAX (13778030, ThermoFisher) y Opti-MEM I (11058-021, Invitrogen). Tras 24 horas de la siembra de las células AGS en pocillos, se realizó la primera transfección en las células AGS. Tras 72 horas de la transfección, las células se limpiaron con PBS 1X y fueron transfectadas por segunda vez en las mismas condiciones. Tras otras 72 horas después de la segunda transfección, las células fueron utilizadas para la realización de técnicas de inmunofluorescencia o para la extracción de ARN total.

11.1.2 siRNA GATA6

Los islotes humanos aislados antes de su cultivo fueron pretratados con 1 mL de Tripsina + HBSS 0,5 X (14170-088, Gibco) durante 3 minutos en el incubador a 37 °C.

Posteriormente se cultivaron en medio completo CMRL-1066 suplementado con 1% de P/S, 1% de glutamina 2mM, 10% de FBS, 2 mM L-glutamina y 1% de gentamicina (15750060, ThermoFisher) (Jimenez-Moreno *et al.*, 2015). Se utilizaron 300 islotes por pocillo en placas de 6 pocillos. Tras 48 horas de cultivo en un incubador a 37 °C, los islotes fueron transfectados con oligofectamina (12252-011, ThermoFisher) y Opti-MEM I con Stealth RNAi™ siRNA, como control negativo, o siRNA GATA6 (14465, ON-TARGETplus SMARTpool, Mouse GATA6 5 nmol, Thermo), durante 48 horas, según las indicaciones del fabricante. Este procedimiento fue realizado en el laboratorio del Dr. Gauthier, en CABIMER.

Tras la transfección, los islotes de cada pocillo fueron limpiados con PBS 1X y recogidos en un Eppendorf y fueron centrifugados a máxima velocidad durante 5 minutos. Se extrajo el ARN total de cada muestra, siguiendo el mismo protocolo indicado en el apartado 8.1 de Materiales y métodos. Posteriormente el ARN fue utilizado para qPCR como se indica en el apartado 8.3 de Materiales y métodos.

11.2 Infección con adenovirus

Los islotes de los ratones *Gata6^{flox/flox}* se cultivaron en placas de 6 pocillos (140675, ThermoFisher) con medio RPMI 1640 (1X) (11879-020, Gibco) suplementado con 1% de P/S, 1% de glutamina 2 mM (25030081, Gibco), 10% de FBS, 1 mM de piruvato de sodio (11360-39, Gibco), 50 µM β-mercaptoetanol (31350-010, Gibco) y 10 mM de HEPES (15630106, ThermoFisher). Se cultivaron 300 islotes por pocillo en placas de 6 pocillos. Tras 5 horas de cultivo en un incubador a 37 °C, fueron infectados con 9×10^7 IFU/pocillo durante 72 horas con Ad-Cre o Ad-GFP, como control.

Tras la infección, los islotes de cada pocillo fueron limpiados con PBS 1X y recogidos en un Eppendorf y fueron centrifugados a máxima velocidad durante 5 minutos. Se extrajo el ARN total de cada muestra, siguiendo el mismo protocolo indicado en el apartado 8.1 de Materiales y métodos. Posteriormente el ARN fue utilizado para qPCR como se indica en el apartado 8.3 de Materiales y métodos.

11.3 Electrofisiología de islotes aislados

Los análisis de electrofisiología realizados en los islotes de Langerhans aislados de ratones *Gata6^{flox/flox}* y de ratones *G6KO* fueron realizados en el laboratorio del Dr. Iván Quesada en la Universidad Miguel Hernández, Elche, con el que mantuvimos una colaboración.

Se analizaron las señales de calcio de los islotes en condiciones de baja y alta concentración de glucosa en islotes purificados a partir de 3 ratones control y de 3 ratones *G6KO*, estando cada muestra formada por 12 islotes. Tras ser aislados los islotes fueron cultivados como se indica en el apartado 11.2 durante 2 horas. Después los islotes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 2 μ M de Fura-2, un sensor fluorescente de unión al calcio intracelular. Los datos fueron tomados de islotes intactos bajo un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200; Zeiss) y las imágenes fueron tomadas cada 3 segundos. Los resultados fueron expresados como la ratio de fluorescencia a 360 y 380 nm (F360/380). El área bajo la curva (ABC), como indicador del aumento global de calcio intracelular, fue calculado en los últimos 7 minutos y 30 segundos de cada estímulo de glucosa utilizando el software Origin (Gonzalez *et al.*, 2013). Durante las medidas, los islotes fueron perfundidos con una solución tampón de bicarbonato de Krebs a pH 7.4, que contenía las diferentes concentraciones de glucosa.

11.4 Respuesta de secreción de insulina *in vitro* de islotes aislados

Para medir la capacidad de secreción de insulina *in vitro*, los islotes aislados de 10 ratones *Gata6^{flox/flox}* y 10 ratones *G6KO* fueron incubados a 2,8 nmol/L o 16,7 nmol/L de glucosa durante 1 hora a 37 °C en placas de 24 pocillos. Se utilizaron 10 islotes de tamaño similar por triplicado por condición experimental. Tras la incubación, el medio fue recogido y se midió la cantidad de insulina secretada mediante kit *Mouse Insulin ELISA* (10-1132-01, Mercodia). Los islotes fueron recogidos y centrifugados a máxima velocidad y el *pellet* fue resuspendido en un tampón Tris-EDTA y lisado pasando 5 veces a través de una aguja de 25 G y 5 veces por una aguja 30 G, para extraer el contenido de insulina total mediante kit *Mouse Insulin ELISA* para la normalización de la secreción de insulina.

11.5 Contenido de insulina total de islotes aislados

Para la determinación del contenido total de insulina en islotes de ratón se aislaron islotes de 14 ratones *Gata6*^{flox/flox} y de 13 ratones *G6KO*. Los islotes fueron lisados en tampón Tris-EDTA y pasados 5 veces a través de una aguja de 25 G y 5 veces por una aguja 30 G. Se centrifugó y se recogió el sobrenadante para medir la insulina contenida mediante kit *Mouse Insulin ELISA*. El contenido de ADN total de los islotes fue medido con el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (P11496, Thermo), según las indicaciones del fabricante.

11.6 Contenido de insulina en páncreas total adulto

Se cuantificó el contenido de insulina en el páncreas total de 5 ratones *Gata6*^{flox/flox} y de 5 ratones *G6KO*. Se diseccionaron los páncreas y fueron disgregados con el homogenizador Polytron en tampón Tris-EDTA. Las muestras fueron centrifugadas y se recogió el sobrenadante para medir la insulina contenida mediante kit *Mouse Insulin ELISA*. El contenido de proteína total de los páncreas fue medido por el método Bradford (B6916, Sigma-Aldrich).

12. Cuantificaciones

12.1 Cuantificación de células apoptóticas y en proliferación

La técnica de inmunofluorescencia fue utilizada para analizar la proliferación y apoptosis de los islotes de los ratones *G6KO*. Para detectar las células apoptóticas se utilizó el kit *In situ Cell Death Detection (Fluorescein)* (11684795910, Roche), según las indicaciones del fabricante, y para la detección de proliferación se marcaron las células con el anticuerpo Ki67 (RM9106, Labvision).

Se cuantificaron las células positivas para Ki67 en los islotes de cortes histológicos pancreáticos de 10 ratones *Gata6*^{flox/flox} y 10 ratones *G6KO*.

12.2 Cuantificación de masa β mediante inmunodetección de insulina

Para la cuantificación de área de masa β se utilizaron cortes histológicos de páncreas de 5 ratones *Gata6^{flox/flox}* y 5 ratones *G6KO*. Se obtuvieron 100 portaobjetos de cortes de 6 μm , y se seleccionaron 10 portaobjetos (1 portaobjeto cada 60 μm) (Muñoz-Bravo *et al.*, 2013). Para detectar y cuantificar la masa β se utilizó el marcaje para la insulina, y para cuantificar el área total de páncreas se utilizó el marcaje con DAPI.

Las imágenes de las inmunofluorescencias fueron tomadas con el Microscopio automático de fluorescencia Nikon NiE-eclipse y fueron procesadas y cuantificadas con el programa ImageJ. El área de masa β fue calculada como el porcentaje de área de insulina con respecto al área total pancreática.

12.3 Cuantificación de gránulos de secreción de insulina en la célula β

Se cuantificaron los gránulos de insulina de 20 imágenes de MET obtenidas a partir de los islotes aislados de 6 ratones *Gata6^{flox/flox}* y *G6KO* como se describe en la bibliografía indicada (Wijesekara *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2016), utilizando el programa ImageJ.

12.4 Cuantificación de células positivas para NGN3 en el páncreas dorsal

Para la cuantificación de células positivas para NGN3 en el páncreas dorsal de los embriones E17.5 se utilizaron cortes histológicos de páncreas de 3 embriones *Gata4^{flox/flox}* y de 3 ratones *G4KO*. La NGN3 se cuantificó como área total de páncreas positivo para este marcador, y se normalizó con respecto al número de células total marcadas con DAPI. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con el Microscopio Leica AF6000 (DM6000B) y fueron procesadas y cuantificadas con el programa ImageJ.

13. Análisis estadístico

Los valores han sido expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) o desviación estándar (SD). Para los análisis estadísticos se empleó el programa GraphPad Prism 5.01. Se realizó el test t de Student en dos colas y para el test de tolerancia a la

glucosa se utilizó en test de ANOVA con la corrección de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor $P \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

PARTE A. Papel del factor de transcripción GATA6 en la función de la célula β

1. Desarrollo de intolerancia a la glucosa en los ratones deficientes en *Gata6*

Como se mencionó en la Introducción, estudios previos del grupo del Dr. Hattersley y otros han mostrado que mutaciones en el gen *GATA6* en humanos causan un amplio fenotipo que va desde agenesia pancreática, el fenotipo más prevalente, hasta la aparición de diabetes en el adulto con o sin insuficiencia exocrina (De Franco *et al.*, 2013). Un estudio reciente ha mostrado que las células β obtenidas a partir de células pluripotentes humanas modificadas en el gen *GATA6* presentan defectos en la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Tiyaboonchai *et al.*, 2017). Sin embargo, en otro estudio similar, las células β generadas no presentan ningún defecto en su función (Shi *et al.*, 2017b).

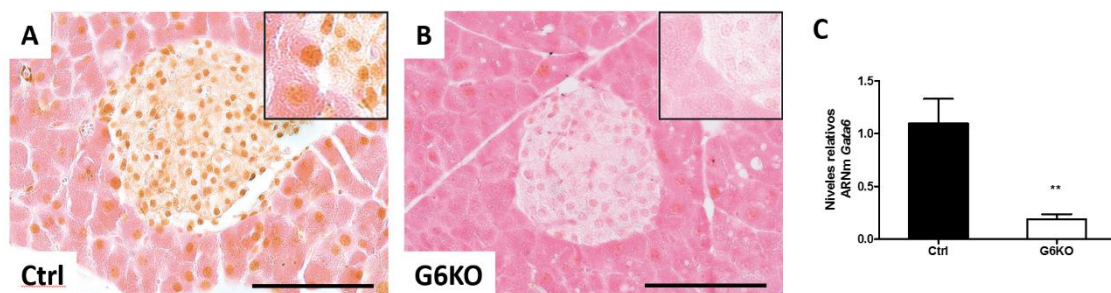


Figura 23. Los páncreas deficientes para *Gata6* presentan una eficiente escisión de *Gata6*. (A): El análisis inmunohistoquímico de secciones pancreáticas utilizando un anticuerpo anti-GATA6 muestra la expresión nuclear de la proteína GATA6 en el tejido acinar y en el islote en los ratones control (Ctrl) a los 2 meses de edad. (B): Se observa una escisión eficiente del alelo *floxeado* *Gata6* mediante inmunodetección en los compartimentos exocrinos y endocrinos del ratón *Gata6* KO (*G6KO*) y (C) disminución de los transcritos de *Gata6* cuantificado mediante qPCR. Las imágenes insertadas en A y B son aumentos de áreas seleccionadas. Los valores representados son medias \pm SEM de $n=7$ agrupados de islotes por grupo experimental (cada agrupado contiene islotes procedentes de 3 ratones). ** $P < 0,01$. Barra de escala: 100 μ m.

Para esclarecer la contribución de GATA6 a la función de la célula β , en esta tesis hemos analizado la homeostasis de la glucosa en ratones deficientes para *Gata6*. Para ello hemos usado un modelo de ratón mutante condicional para el gen *Gata6* (ratón *G6KO*, de aquí en adelante). Para ello se cruzaron los ratones *Gata6*^{*flox/flox*} con los ratones *Pdx1-Cre*. La línea *Pdx1-Cre* expresa la recombinasa Cre en los progenitores pancreáticos,

inactivando específicamente *Gata6* en las células del dominio *Pdx1* mediante la tecnología *Cre/LoxP*. Para comprobar la eficiente inactivación de *Gata6* en el páncreas se realizaron análisis de inmunohistoquímica de cortes histológicos de ratones control y *G6KO* de 2 meses de edad usando un anticuerpo específico para GATA6 y a continuación, los tejidos se contratiñeron con eosina para identificar mejor la arquitectura del tejido. También se cuantificó los niveles de ARNm de *Gata6* mediante técnicas de qPCR a partir de ARN total de islotes pancreáticos aislados de 7 muestras para cada grupo (cada muestra compuesta por islotes procedentes de 3 ratones).

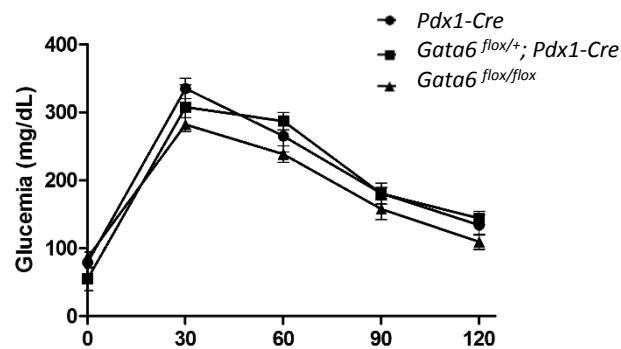


Figura 24. Gráfica del test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal de los ratones control. No se observan diferencias entre las concentraciones de glucosa en sangre a niveles basales, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la administración de glucosa intraperitoneal en los ratones machos *Gata6^{flox/flox}*, *Gata6^{flox/+}; Pdx1-Cre* y *Pdx1-Cre* a los 6 meses de edad. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=12 *Gata6^{flox/flox}*, n=6 *Gata6^{flox/+}; Pdx1-Cre* y n=7 *Pdx1-Cre*).

Como se observa en los ratones control, la proteína GATA6 está presente en los islotes y en los acinos pancreáticos. Sin embargo, en los ratones *G6KO* no se observa inmunodetección de GATA6 en ninguna célula pancreática, acinar, endocrina o ductal (Fig. 23). La cuantificación de ARNm de *Gata6* en islotes de ratones *G6KO* mostró una dramática reducción en los ratones *G6KO* comparados con el control (Fig. 23C). Estos resultados muestran una eficiente inactivación del gen *Gata6* en las células pancreáticas de los ratones *G6KO*.

Para determinar la función de GATA6 en el páncreas endocrino adulto, examinamos la homeostasis de la glucosa en los ratones *G6KO*. Tanto los ratones *Gata6^{flox/flox}* como los ratones *Gata6^{flox/+}; Pdx1-Cre* y los ratones *Pdx1-Cre* presentan el mismo grado de tolerancia a la glucosa, por lo que en los siguientes estudios usamos ratones *Gata6^{flox/flox}* como ratones control (Fig. 24).

Los análisis de tolerancia a la glucosa mediante inyecciones intraperitoneales de glucosa en ratones en ayunas, mostraron que tanto los ratones machos como los ratones hembra *G6KO* de 2 a 4 meses de edad presentaron una tolerancia a la glucosa similares a sus hermanos de camada controles (Fig. 25). Sin embargo, cuando se realizó el mismo ensayo de tolerancia en estos ratones a los 6 meses de edad se observó una disminución

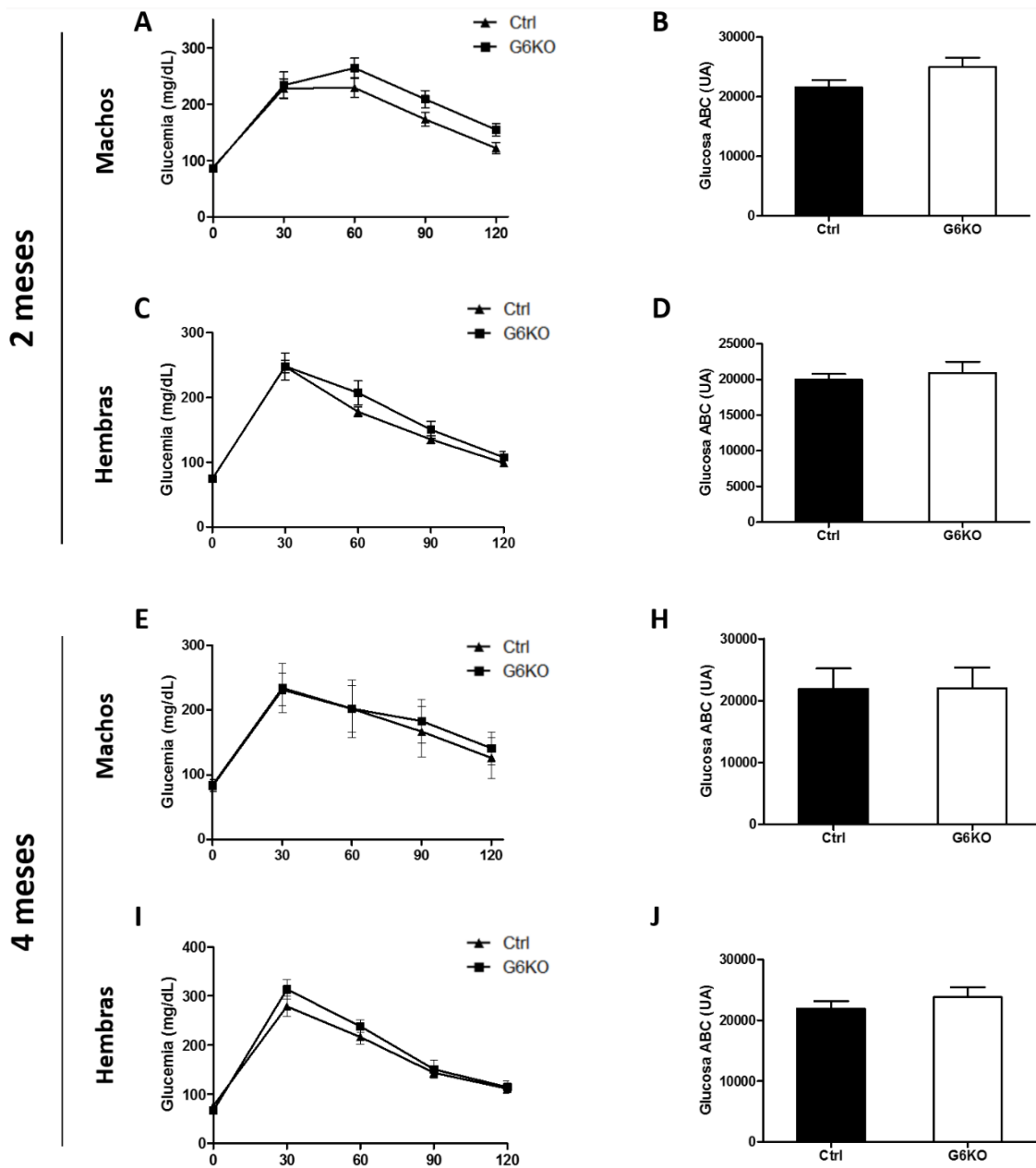


Figura 25. Gráficas del test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal de los ratones machos y hembras a los 2 y 4 meses de edad. La concentración de glucosa en sangre a niveles basales, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la inyección intraperitoneal de glucosa entre los ratones control (Ctrl) y *G6KO* machos (**A, E**) y hembras (**C, I**) a los 2 (**A, C**) y 4 (**E, I**) meses de edad es normal. La glucosa total del área bajo la curva (ABC) en unidades arbitrarias (UA) son similares entre los ratones Ctrl y *G6KO* machos (**B, H**) y hembras (**D, J**) a los 2 (**B, D**) y 4 (**H, J**) meses de edad. $n \geq 18$ ratones macho y ≥ 12 ratones hembra, de cada genotipo y edad. Los datos se expresan como la media \pm SEM.

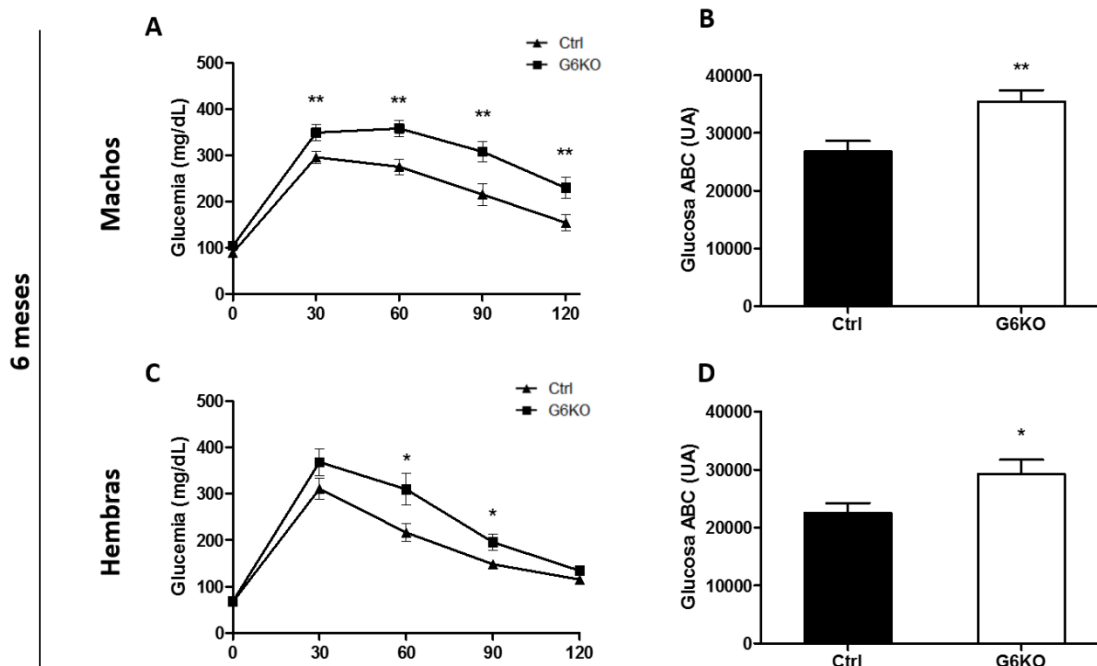


Figura 26. Los ratones machos y hembras *G6KO* desarrollan intolerancia a la glucosa a los 6 meses de edad. Concentración de glucosa en sangre a niveles basales, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la inyección intraperitoneal de glucosa entre los ratones control (Ctrl) y *G6KO* machos (A) y hembras (C) a los 6 meses de edad. La glucosa total del área bajo la curva (ABC) en unidades arbitrarias (UA) aumenta significativamente en los ratones *G6KO* machos (B) y hembras (D) comparados con los ratones control a los 6 meses de edad. $n \geq 18$ ratones macho y ≥ 12 ratones hembra, de cada genotipo. Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

significativa en la tolerancia a la glucosa en comparación con los ratones control (Fig. 26). El fenotipo de intolerancia a la glucosa de los ratones *G6KO* se mantuvo a lo largo del tiempo, incluso en ratones de un año de edad. Sin embargo, el grado de intolerancia no aumentó (Fig. 27). Hay que hacer notar que, a pesar de la intolerancia a la glucosa

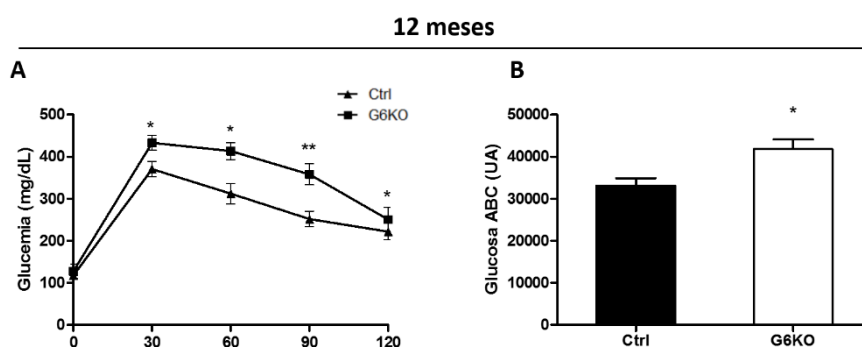


Figura 27. Los ratones machos *G6KO* mantienen el grado de intolerancia a la glucosa a los 12 meses de edad. Concentración de glucosa en sangre a niveles basales, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la inyección intraperitoneal de glucosa entre los ratones control (Ctrl) y *G6KO* machos 12 meses de edad. La glucosa total del área bajo la curva (ABC) en unidades arbitrarias (UA) aumenta significativamente en los ratones *G6KO* machos comparados con los ratones control a los 12 meses de edad. $n \geq 18$ ratones de cada genotipo. Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0,01$.

que se observa a partir de los 6 meses de forma significativa, no hay diferencias en las glucemias basales en condición de ayuno entre los ratones control y los ratones *G6KO* incluso en edades más tardías (Fig. 28).

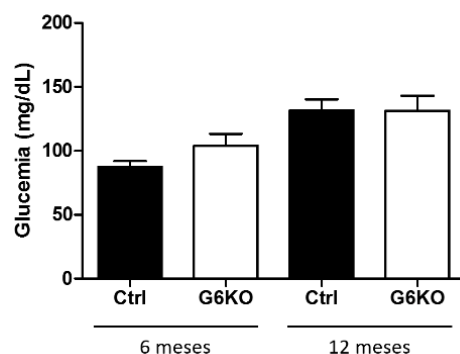


Figura 28. Los niveles de glucosa basal en condiciones de ayuno son similares entre los ratones Ctrl y *G6KO* a los 6 y 12 meses de edad. Los valores se expresan como la media \pm SEM. $n=15$ ratones de cada genotipo y edad.

Los ratones *G6KO* no presentaron defectos en la resistencia a la insulina. Estos resultados, publicados en la tesis doctoral del Dr. Manuel Carrasco (2016), son esperables dado que la inactivación de *Gata6* es específica del páncreas y la resistencia a insulina está asociada a defectos en el hígado (Fig. 29).

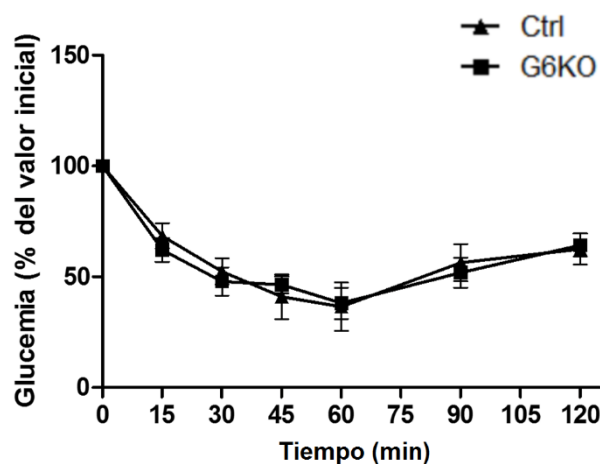


Figura 29. Gráfica del test de tolerancia a la insulina. No se aprecian diferencias significativas al realizar el test de tolerancia intraperitoneal a la insulina (ITT) entre los ratones *G6KO* y Ctrl a los 6 meses de edad ($n=6$ ratones por cada genotipo). Los datos se expresan como la media \pm SEM.

El conjunto de estos resultados muestra que los ratones deficientes para *Gata6* desarrollan intolerancia a la glucosa con la edad, independientemente del sexo,

indicando por tanto, que GATA6 juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa y en la función de la célula β pancreática.

Para analizar si la pérdida de función de GATA6 afectaba a la arquitectura del tejido pancreático, se realizaron análisis histológicos mediante tinciones con hematoxilina y eosina. En los ratones *G6KO* recién nacidos (P1) y de 2 meses de edad no se encontraron anomalías en la morfología de las células pancreáticas (Fig. 30). A medida que avanza la edad, los ratones *G6KO* presentaban pérdida de tejido acinar que había sido reemplazando por células de grasa, y además se observó la presencia de lesiones metaplásicas acinares a ductales (*Acino-Ductal Metaplasia*, ADM). Esta transformación del tejido acinar empieza a ser apreciable a partir de los 4 meses de edad y se va aumentando con la edad (Fig. 31). Estos resultados coinciden con estudios previos

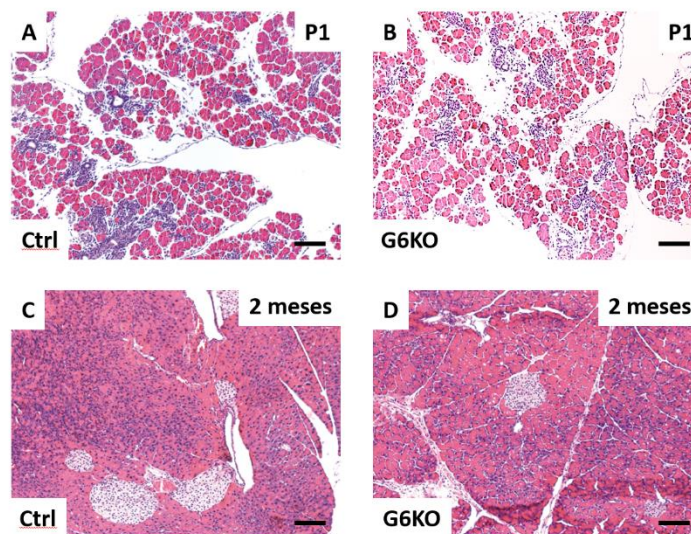


Figura 30. Tinciones del tejido pancreático de los ratones recién nacidos y a los 2 meses de edad. El análisis histológico del páncreas de los ratones Ctrl y *G6KO* recién nacidos (P1) (A, B) y a los 2 meses (C, D) de edad mediante tinciones con hematoxilina y eosina muestran que no existen anomalías morfológicas de las células pancreáticas. Barra de escala: 100 μ m.

donde describieron el factor de transcripción GATA6 como un factor esencial para el mantenimiento de la identidad acinar pancreática (Martinelli *et al.*, 2013).

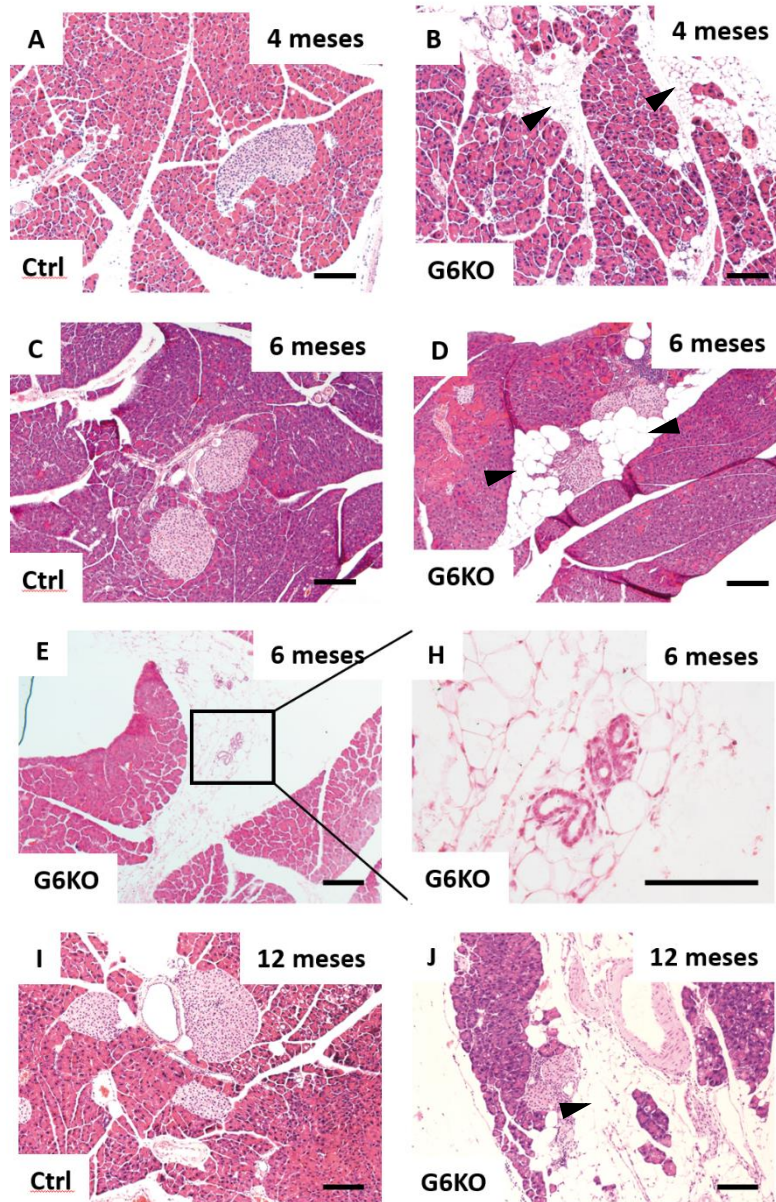


Figura 31. Los páncreas de los ratones *G6KO* presentan alteraciones en el compartimento acinar pero una arquitectura de los islotes normal. Las tinciones con hematoxilina y eosina de las secciones pancreáticas de los ratones *G6KO* y Ctrl muestran que a los 4 meses de edad el tejido acinar es reemplazado por tejido adiposo (B, puntas de flecha) y se agrava con la edad (puntas de flecha en D, J) en los ratones *G6KO*. E y H: también se observan lesiones metaplásicas acinares a ductales. El área encuadrada de la imagen E muestra un aumento en la imagen H. Barra de escala: 100 μ m.

Para comprobar si la arquitectura de las células acinares en ausencia de GATA6 se encontraba alterada, se evaluó la polaridad de los acinos mediante inmunofluorescencia para los marcadores e-cadherina y mucina. Estos estudios se realizaron en ratones de 2 y 6 meses de edad. La polaridad de las células acinares de los ratones *G6KO* era normal como se observa con la expresión del marcaje basolateral e-cadherina y la expresión del marcaje apical mucina, no encontrándose diferencias con los ratones control (Fig. 32). Para medir la integridad de las células acinares, se cuantificó la actividad amilasa a partir

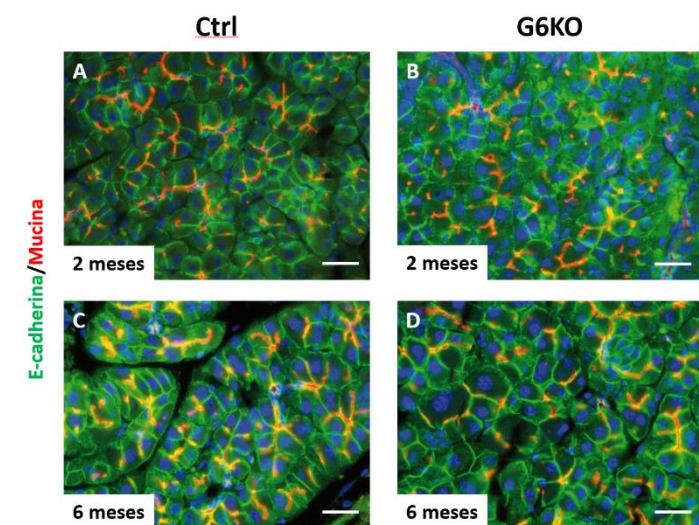


Figura 32. La arquitectura de las células acinares es normal en los ratones *G6KO*. Los análisis de inmunofluorescencia de las secciones de tejido pancreático a 2 (A, B) y 6 meses de edad (C, D) con E-cadherina (verde) y mucina (rojo) muestran que la polaridad de las células acinares de los ratones *G6KO* es normal comparada con los ratones Ctrl.

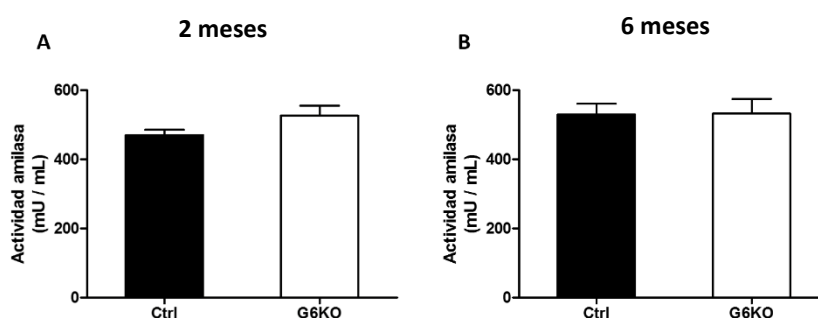


Figura 33. La función acinar es normal en los ratones *G6KO*. La cuantificación de la actividad amilasa en plasma de los ratones a los 2 (A) y 6 (B) meses de edad muestra que no existen diferencias entre los ratones Ctrl y *G6KO*. Los valores se expresan como la media \pm SEM.

del plasma de ratones *G6KO* y control, a 2 y 6 meses. La actividad amilasa en suero de los ratones *G6KO* fue similar a la de los ratones control (Fig. 33). Por lo tanto, a pesar de

la pérdida de tejido acinar en los mutantes *G6KO*, la función pancreática acinar no se vio afectada.

2. Reducción del contenido de insulina y defectos en la secreción de los ratones *knockout* para GATA6

La inactivación del gen *Gata6* en nuestro modelo animal ocurre en estadios tempranos del desarrollo del páncreas. Por lo tanto, podríamos pensar que los defectos en la homeostasis de la glucosa observados en los ratones *G6KO* podrían deberse a defectos en la formación y/o arquitectura del islote. Para ellos se realizó inmunodetección para distintos tipos de células productoras de hormonas, insulina, glucagón, somatostatina y células PP en cortes de páncreas de ratones a los 6 meses. La organización de las células endocrinas en el islote de los ratones *G6KO* fue similar a la de los ratones control, con las células β productoras de insulina en el centro del islote y las de glucagón en la periferia (Fig. 34). Sin embargo, estos análisis de inmunofluorescencia revelaron que mientras que la señal de inmunodetección para hormonas como glucagón, PP y

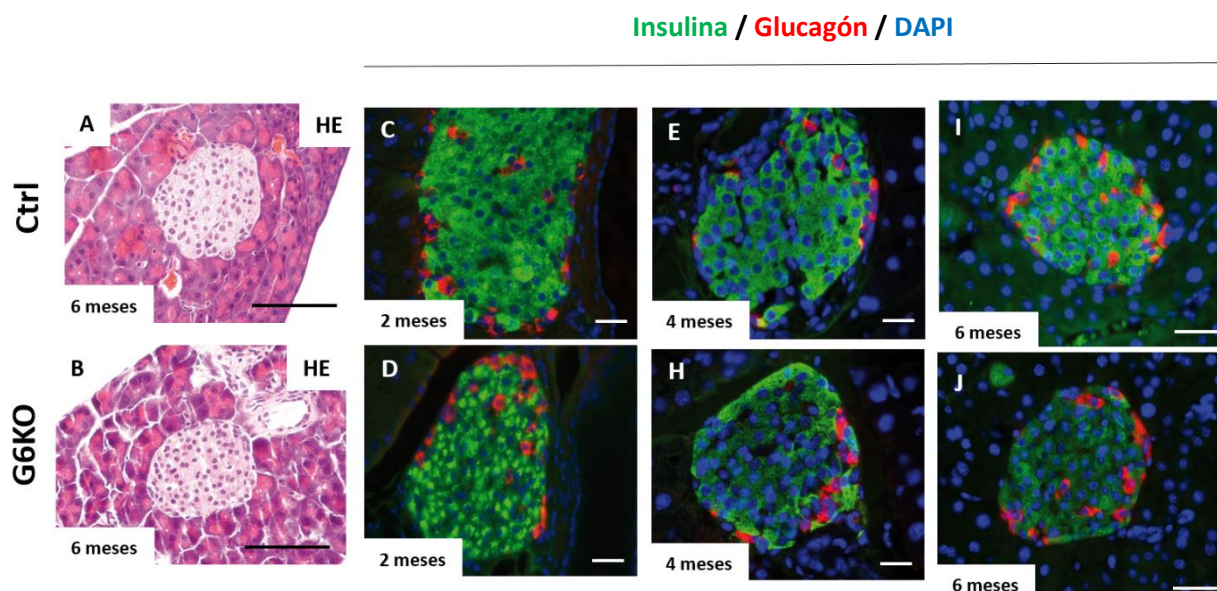


Figura 34. A y B: La tinción con hematoxilina y eosina (HE) muestra que la arquitectura de los islotes de los ratones *G6KO* es normal en comparación con los islotes de los ratones Ctrl. Las inmunofluorescencias para insulina (verde) y glucagón (rojo) a los 2, 4 y 6 meses de edad muestran que la organización de las células endocrinas es normal, con las células β en el centro y las células α en la periferia, en los ratones *G6KO* (D, H y J) en comparación con los ratones Ctrl (C, E e I). Sin embargo, a partir de los 4 meses de edad se observa una disminución en la acumulación de la insulina en los islotes de los ratones *G6KO* (H, J) en comparación con los ratones Ctrl (E, I). Barra de escala: 25 μ m.

somatostatina eran similares a la observada en islotes de ratones control, la señal para la insulina estaba dramáticamente disminuida con respecto a la de los ratones control.

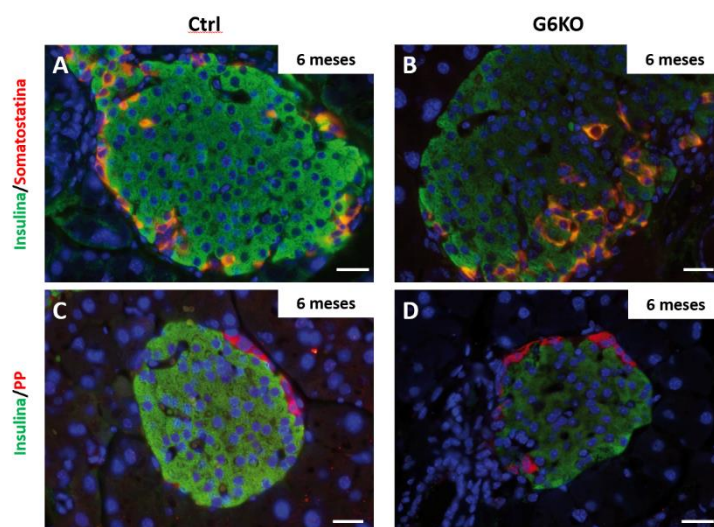


Figura 35. La distribución del resto de células endocrinas del islote es normal en los ratones *G6KO*. Las inmunofluorescencias para somatostatina (rojo) (A, B) y polipéptido pancreático (rojo) (C, D) a los 6 meses de edad muestran que la organización del resto de células endocrinas es normal en los ratones *G6KO* (B, D) en comparación con los ratones Ctrl (A, C). Barra de escala: 25 μ m.

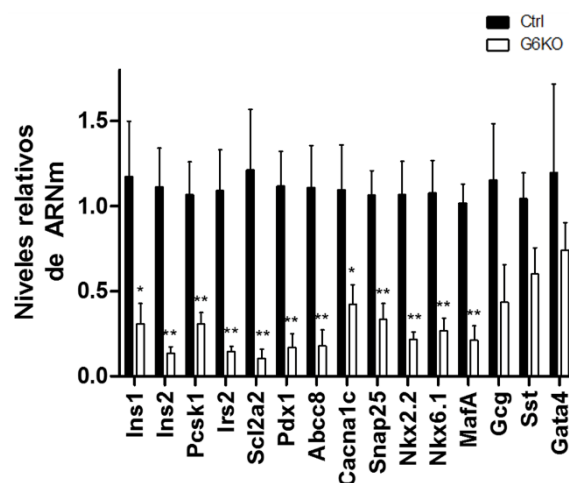


Figura 36. Cambios en la expresión génica en los islotes de los ratones *G6KO*. El análisis de qPCR del ARN total de islotes aislados agrupados de los ratones Ctrl y *G6KO* de 2 meses de edad muestra que los niveles de transcrito de los genes clave involucrados en la síntesis y secreción de la insulina disminuyen drásticamente en los islotes de los ratones *G6KO* en comparación con los ratones Ctrl. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en los niveles de transcrito del glucagón, somatostatina y *Gata4*. Los datos están normalizados con los niveles de ARNm de la β -actina y se expresan como la media \pm SEM ($n=7$ agrupados de islotes aislados para cada grupo; cada agrupado contiene islotes procedentes de 3 ratones). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Esta disminución era apreciable en ratones de 4 meses y la disminución de la señal disminuía a medida que los ratones envejecían (Fig. 34 y 35).

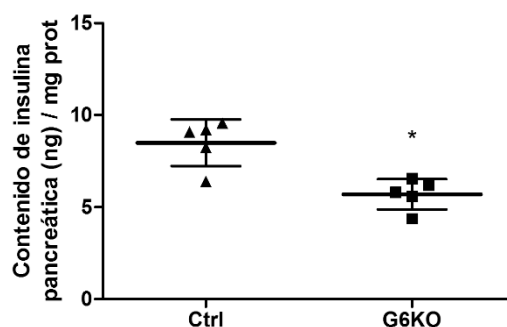


Figura 37. El contenido de insulina pancreática respecto al contenido de proteínas pancreáticas totales disminuye en los ratones *G6KO* en comparación con los ratones Ctrl a los 6 meses de edad (n=5 ratones por grupo). Los datos se expresan como la media \pm SD. * $P \leq 0,05$.

Los resultados de los análisis de inmunofluorescencia fueron confirmados a nivel transcripcional mediante qPCR en islotes seleccionados de ratones de 2 meses de edad. Los genes *Ins1* e *Ins2*, los cuales codifican para la proteína de la insulina, presentaban una expresión disminuida en los islotes de los ratones *G6KO* comparados con los controles. La expresión del resto de genes que codifican para hormonas pancreáticas, como glucagón (*Gcg*) y somatostatina (*Sst*), no disminuyeron en los islotes de los ratones *G6KO* (Fig. 36). Estos resultados se correlacionan con los observados mediante inmunofluorescencia en los islotes pancreáticos.

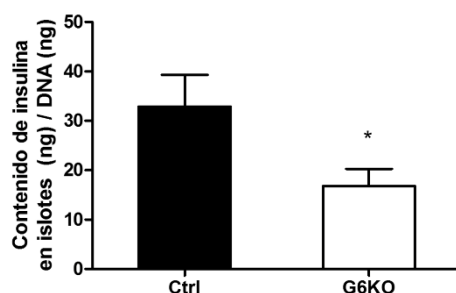


Figura 38. Los islotes aislados de los ratones *G6KO* muestran una reducción significativa en el contenido de insulina comparado con los islotes de los ratones Ctrl (n=14 ratones por grupo). El contenido de insulina se ha normalizado respecto a los ng de DNA por islote. Los valores se expresan como la media \pm SEM. * $P \leq 0,05$.

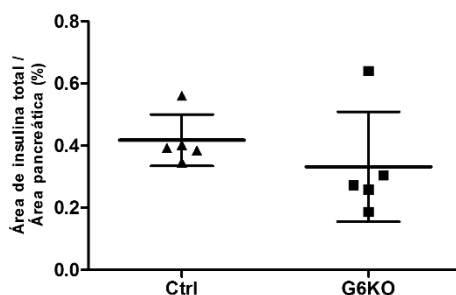


Figura 39. Representación del área de células β como la ratio del área de células positivas para insulina por el área total pancreática utilizando el software ImageJ. No se observan diferencias significativas entre el área de masa β de los ratones *G6KO* y Ctrl a los 6 meses de edad ($n=5$ ratones por grupo). Los valores se representan como la media \pm SD.

Para cuantificar la disminución en el contenido de insulina que indican los resultados anteriores de inmunofluorescencia, medimos el contenido de insulina total en el páncreas respecto al contenido de proteínas pancreáticas totales en ratones de 6 meses de edad. Estos análisis confirmaron la disminución de niveles de insulina, significativamente menores en los ratones deficientes en GATA6 respecto a los ratones control (Fig. 37).

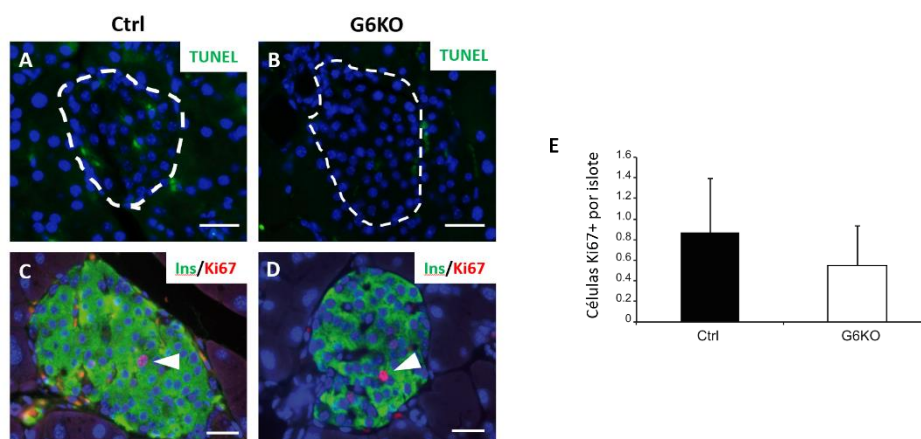


Figura 40. Análisis de la proliferación y apoptosis de los islotes de los ratones *G6KO* y Ctrl. El ensayo de TUNEL (verde) realizado en las secciones de tejido pancreático de los ratones Ctrl (**A**) y *G6KO* (**B**) no muestra cambios en el número de células apoptóticas entre ambos grupos. Tampoco se observan diferencias en el número de células en proliferación, marcadas con Ki67 (rojo), entre los ratones *G6KO* (**D**) y Ctrl (**C**). **E:** Cuantificación del número de células positivas para Ki67 en los islotes. Los valores se expresan como la media \pm SEM. Barra de escala: 25 μ m.

La cuantificación del contenido de insulina en islotes aislados de los ratones *G6KO* corroboraron el defecto en biosíntesis de insulina en islotes de ratones *G6KO*, siendo 2,5 veces menor que la de los ratones control (Fig. 38).

Todos estos resultados indican que la intolerancia a la glucosa observada en ratones deficientes en *GATA6* se debe, al menos en parte, a una disminución en la biosíntesis de insulina.

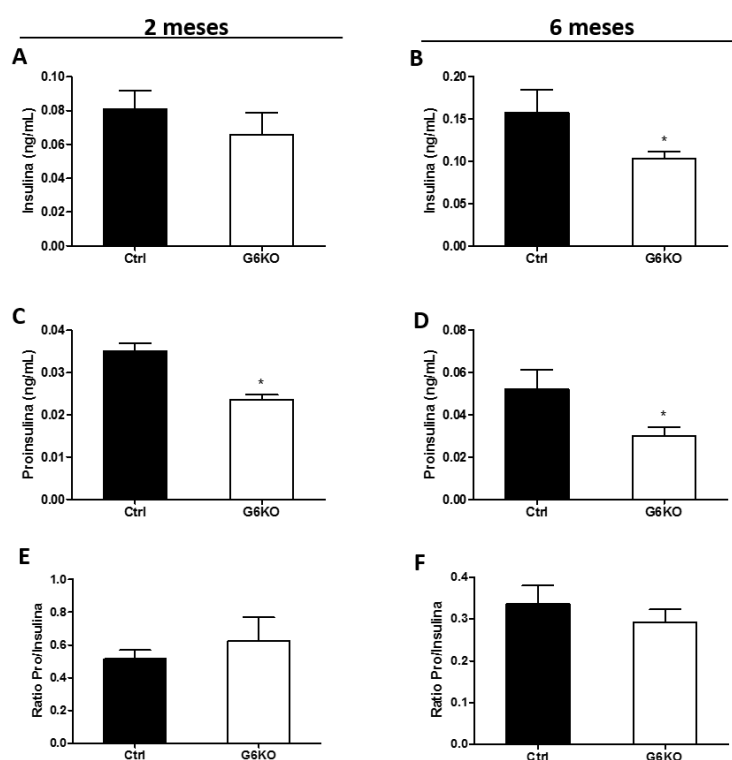


Figura 41. Cuantificación de los niveles circulantes de insulina y proinsulina en plasma a los 2 y 6 meses de edad. Se cuantificó la insulina y proinsulina en plasma tras 12 horas de ayuno de los ratones Ctrl y de los ratones *G6KO* a los 2 (**A, C y E**) y 6 (**B, D y F**) meses de edad. A los 2 meses los ratones *G6KO* presentan niveles basales de proinsulina más bajos que los ratones Ctrl (**C**), sin embargo, la diferencia en los niveles de insulina no es significativa (**A**). A los 6 meses de edad, los ratones *G6KO* siguen teniendo niveles basales de proinsulina menores que los ratones Ctrl (**D**) y los niveles de insulina disminuyen significativamente (**B**). Sin embargo, a ambas edades no se observan diferencias en la ratio de Proinsulina /Insulina entre los ratones *G6KO* y Ctrl (**E, F**). $n \geq 11$ ratones por genotipo y edad. Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $P \leq 0,05$.

GATA6 es un factor transcripcional que ha sido asociado a la proliferación celular en varios tejidos (Ketola *et al.*, 2003; Beuling *et al.*, 2011, 2012). Teniendo en cuenta que en nuestro modelo la inactivación de *Gata6* ocurre en estadios tempranos del desarrollo

pancreático, una posible explicación a la intolerancia a la glucosa podría ser una disminución en el número de células β productoras de insulina en los islotes pancreáticos de los ratones *G6KO*. La cuantificación de área de células β positivas para insulina reveló que existía una tendencia a ser menor el área en ratones *G6KO* que en los ratones control de 6 meses de edad, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Por tanto, no parece plausible que esta pequeña disminución de la masa β en los ratones *G6KO* pudiera explicar el fenotipo de intolerancia a la glucosa observado (Fig. 39). Más aún, los ensayos de TUNEL para determinar la muerte celular y los análisis por inmunofluorescencia del marcador de proliferación Ki67 no revelaron diferencias ni en apoptosis ni en proliferación en los islotes pancreáticos de los ratones *G6KO* comparados con el de los ratones control (Fig. 40).

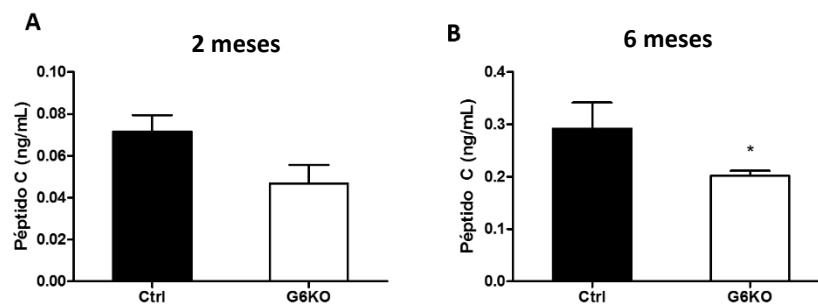


Figura 42. Cuantificación de los niveles circulantes de péptido C en plasma a los 2 y 6 meses de edad. A los 2 meses se observan niveles menores de péptido C en los ratones *G6KO*, sin embargo, la diferencia no es significativa (A) hasta los 6 meses de edad (B). $n \geq 11$ ratones por genotipo y edad. Los valores se expresan como la media \pm SEM. * $P \leq 0,05$.

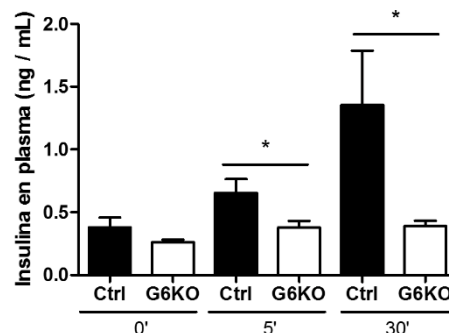


Figura 43. Los niveles de insulina en plasma a niveles basales y tras 5 y 30 minutos de la inyección intraperitoneal de glucosa disminuyen significativamente en los ratones *G6KO* en comparación con los ratones Ctrl a los 6 meses de edad. $n = 10$ ratones por genotipo. Los valores se muestran como la media \pm SEM. * $P = 0,05$.

Todos estos datos indican que el fenotipo de intolerancia a la glucosa de los ratones deficientes en GATA6 no se atribuye a una disminución de la proliferación o un aumento de la tasa de muerte celular que pudieran tener un efecto en la masa de células β .

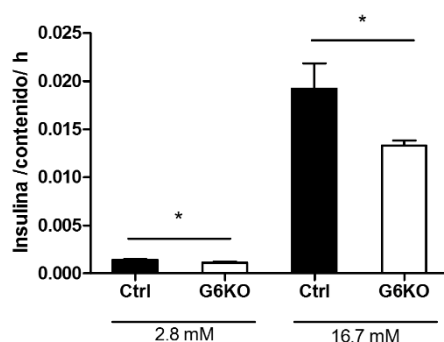


Figura 44. Los ensayos de secreción *in vitro* de islotes aislados de los ratones *G6KO* y Ctrl de 6 meses de edad demuestran que los islotes deficientes para *Gata6* secretan menos insulina del total contenido que los islotes Ctrl en condiciones basales (2.8 mM) y bajo condiciones de alta concentración de glucosa (16.7 mM). N= 10 ratones por genotipo y grupo. Los datos se muestran como la media \pm SEM. *P \leq 0,05.

Para determinar si la pérdida de función de GATA6 en nuestros ratones pudiera afectar también a los niveles de insulina circulante en los ratones *G6KO*, se midió los niveles de insulina, proinsulina y péptido-C en el plasma circulante de los ratones a distintas edades

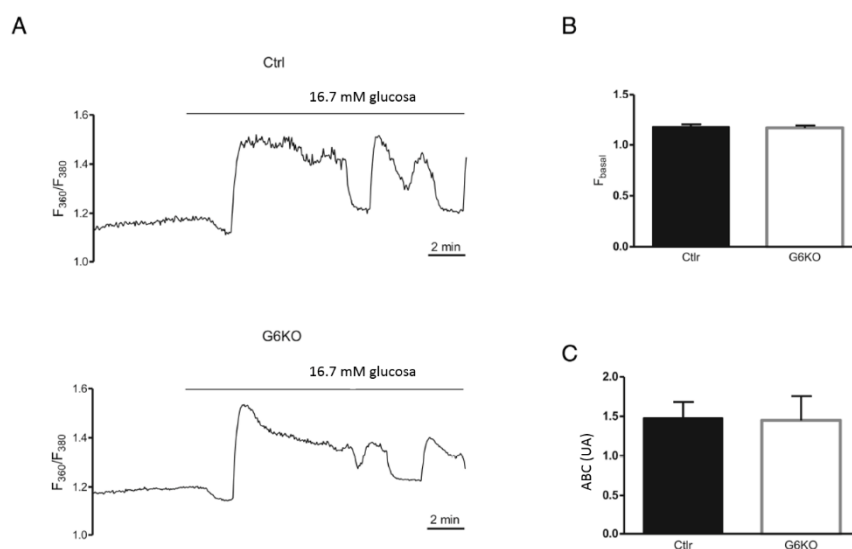


Figura 45. A: Representación gráfica de la señal de calcio en respuesta al aumento en la concentración de glucosa (16.7 mM) en islotes aislados intactos de 3 ratones Ctrl y 3 ratones *G6KO* (n=12 islotes por grupo). **B:** Representación gráfica del análisis de fluorescencia medida a concentraciones basales de glucosa (2.8 mM). **C:** Área bajo la curva (ABC) en unidades arbitrarias (UA) de la respuesta al aumento de concentración de glucosa de los experimentos mostrados en **A**. Los datos se muestran como la media \pm SEM.

sometidos previamente a ayuno. A los 2 meses de edad se observó una discreta disminución tanto de insulina como de proinsulina y de péptido C comparados con los ratones control. Estas diferencias fueron mucho más acusadas en ratones *G6KO* de 6 meses de edad comparados con los ratones control. A pesar de la disminución de insulina y de proinsulina, la ratio proinsulina/insulina fue similar en ratones *G6KO* y control, indicando que el procesamiento de la insulina no estaba afectado en ausencia de GATA6 (Fig. 41 y 42).

Para determinar la capacidad de secreción de insulina en los ratones *G6KO* en respuesta a glucosa, medimos los niveles de insulina circulante en el plasma de los ratones de 6 meses de edad tras una carga intraperitoneal de glucosa. Los resultados mostrados en la Fig. 43 revelaron que pasados 5 minutos o 30 minutos tras la carga de glucosa, los ratones *G6KO* tenían una disminución significativa de insulina en plasma comparados con los ratones control.

También se determinó la función de secreción de insulina de las células β en islotes aislados procedentes de ratones *G6KO* y ratones control de 6 meses de edad. Los islotes fueron cultivados en medio con baja (2,8 mM) y alta (16,7 mM) concentración de glucosa. Dado que los islotes de ratones *G6KO* tienen un menor contenido en insulina, la cantidad de insulina secretada fue normalizada con respecto al contenido total de insulina. De forma similar a los observado *in vivo*, los islotes de los ratones *G6KO* secretaban menos insulina que los islotes de los ratones control tanto en condiciones de baja como alta concentración de glucosa. Curiosamente, la secreción de insulina en respuesta a la glucosa no se vio afectada en ausencia de GATA6, ya que la ratio insulina secretada en altas concentraciones/insulina secretada en condiciones basales fue similar entre ratones *G6KO* y controles (Fig. 44). Estos resultados sugieren que los islotes de los ratones *G6KO*, aunque tienen capacidad de responder a la glucosa, presentan defectos en la secreción de insulina.

En colaboración con el grupo del Dr. Iván Quesada en la Universidad Miguel Hernández de Elche, se midió el flujo de calcio intracelular en islotes aislados intactos expuestos a concentraciones crecientes de glucosa, utilizando el sensor de fluorescencia Fura-2,

capaz de detectar el calcio fluorescente. Como se observa en la Fig. 45, las concentraciones de calcio en respuesta a glucosa en islotes de ratones *G6KO* y ratones controles fueron similares. Por lo tanto, estos resultados confirmaron la capacidad de secreción de insulina en respuesta a glucosa en los islotes deficientes en GATA6 comparados con islotes control.

Todos estos resultados mostrados indican que el fenotipo de intolerancia a la glucosa de los ratones *G6KO* puede ser debido a defectos tanto en la producción como en la secreción de la insulina.

3. GATA6 regula la expresión de genes críticos para la biosíntesis y secreción de la insulina

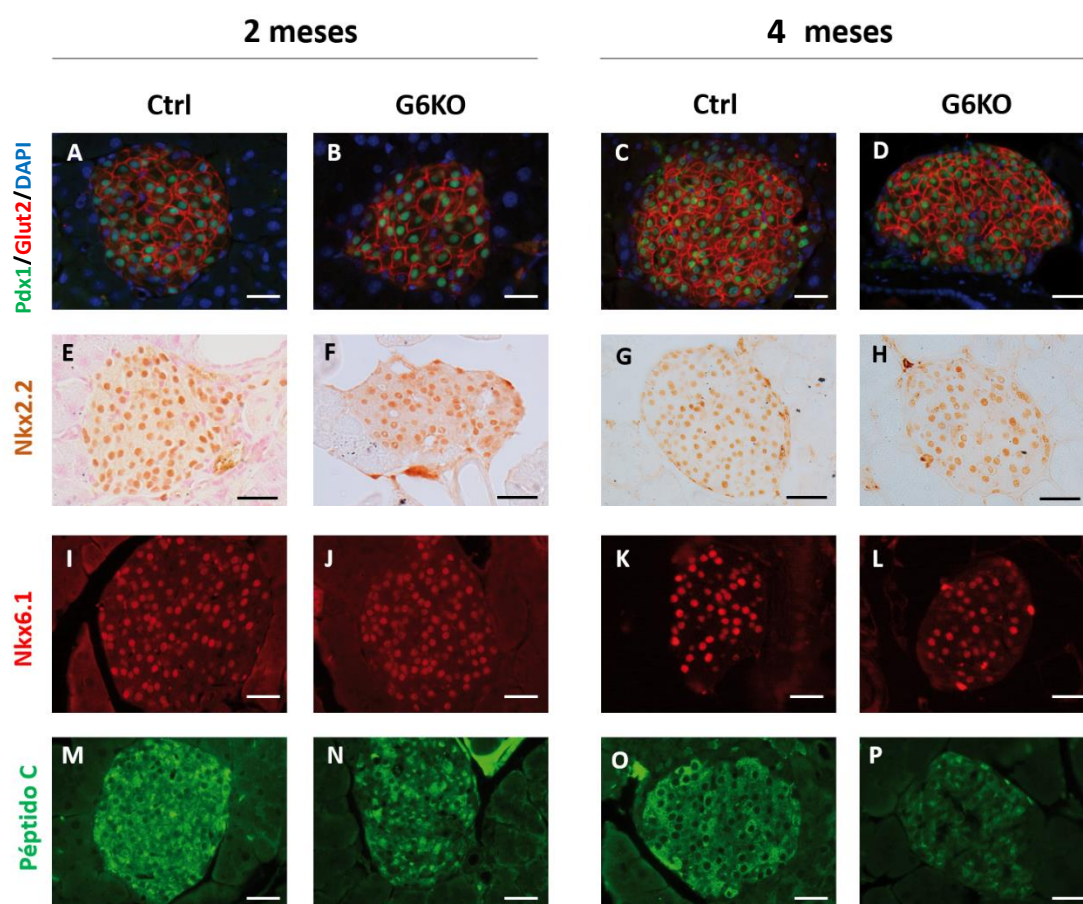


Figura 46. Análisis de inmunofluorescencia de los islotes a los 2 y 4 meses de edad. A los 2 y 4 meses no se observa disminución en Pdx1, Glut2, Nkx2.2 y Nkx6.1 en los islotes de los ratones *G6KO* (2 meses: **B, F y J**; 4 meses: **D, H y L**) en comparación con los ratones Ctrl (2 meses: **A, E e I**; 4 meses: **C, G y K**). Sin embargo, sí se observa una leve reducción del péptido-C en los islotes de los ratones *G6KO* (**N, P**) en comparación con los ratones Ctrl (**M, O**). Barra de escala: 25 μ m.

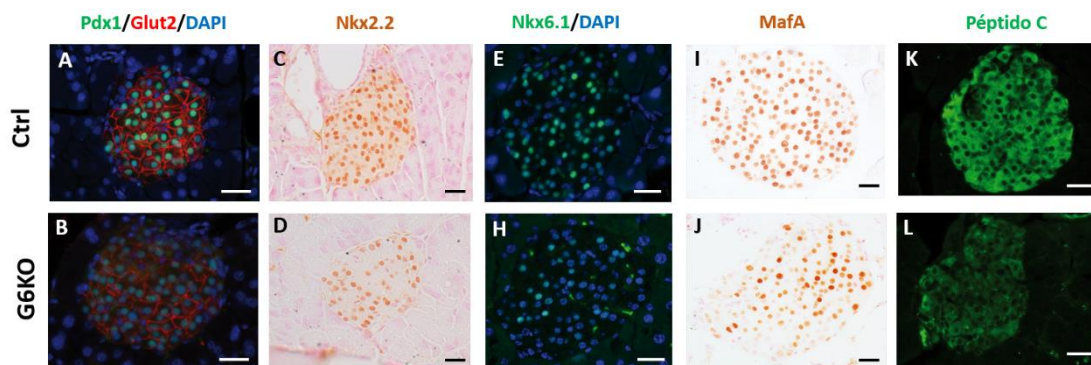


Figura 47. Análisis de inmunofluorescencia de los islotes a los 6 meses de edad. A los 6 meses de edad los análisis de inmunofluorescencia confirman la reducción en Pdx1, Glut2, Nkx2.2, Nkx6.1, MafA y péptido C en los islotes de los ratones *G6KO* (B, D, H, J y L) en comparación con los ratones Ctrl (A, C, E, I y K). Barra de escala: 25 μ m.

Para conseguir esclarecer en más detalle el papel de GATA6 en la función de la célula β , realizamos un análisis de *microarray*, comparando la expresión génica en islotes de ratones control y de ratones *G6KO*. Con el fin de evitar posibles interferencias entre el patrón de expresión génica de los islotes con la intolerancia a la glucosa que presentan los ratones *G6KO* a los 6 meses de edad, la expresión génica se analizó en islotes seleccionados de ratones de 2 meses de edad, cuando el fenotipo de intolerancia no está aún presente.

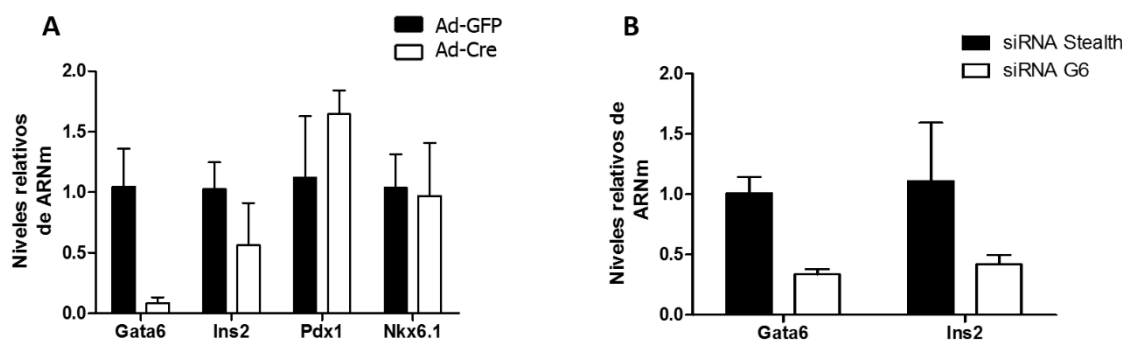


Figura 48. A: Representación gráfica de los niveles de transcritos de los islotes aislados de ratón *Gata6* *flox/flox* de 2 meses deficientes para *Gata6* (infectados con Ad-Cre) e islotes control (infectados con Ad-GFP). La infección de los islotes *Gata6* *flox/flox* con el Ad-Cre tiene una eficiencia de inactivación de *Gata6* del 90% comparado con la infección de los islotes con Ad-GFP. Sin embargo, no existen diferencias entre los niveles de expresión de *Ins2*, *Pdx1* y *Nkx6.1* de los islotes infectados con Ad-Cre y los infectados con Ad-GFP. Los datos están normalizados con los niveles de ARNm de la β -actina y se expresan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=400 islotes por grupo). **B:** Representación gráfica de los niveles de transcritos de los islotes aislados humanos deficientes para *Gata6* (transfectados con *siRNA G6*) e islotes control (transfectados con *siRNA Stealth*). Pese a la eficiencia de inactivación de *Gata6* (60%) de los islotes humanos mediante transfección con el *siRNA G6* respecto a la transfección con el *siRNA Stealth*, la disminución de la expresión de *Ins2* no es significativa. Los datos están normalizados con los niveles de ARNm de la β -actina y se expresan como la media \pm SEM de (n= 300 islotes/pocillo en 6 pocillos por grupo).

El análisis del *microarray* reveló que los genes que presentaban menor expresión fueron aquellos involucrados en diferentes aspectos de la función de la célula β . Como, por ejemplo, en la detección de la glucosa (*Slc2a2*, gen que codifica para el transportador de glucosa GLUT2), en el procesamiento de la insulina (*Pcsk1*), en la secreción de la insulina (*Abcc8*, *Cacna1c*), en la formación de las vesículas secretoras de insulina (*Snap-25*), en el receptor de la insulina (*Irs2*) y los principales reguladores transcripcionales de la función de las células β adultas, como *Pdx1*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *MafA*. También se observó una disminución en los genes *Ins1* e *Ins2*, coincidiendo con los resultados observados mediante qPCR de los islotes pancreáticos anteriormente mostrados.

Estos resultados de expresión génica fueron validados por qPCR y se confirmó la clara disminución de expresión de estos marcadores claves en la maduración de las células β de los islotes deficientes para *Gata6* (Fig. 36).

Un análisis más detallado de los islotes de los ratones G6KO nos permitió confirmar mediante técnicas de inmunofluorescencia y de inmunohistoquímica la disminución en la acumulación de proteínas cuyos transcritos también disminuyeron en los análisis de *microarray*. Hay que hacer notar que mientras que la disminución de transcritos se observó en ratones de 2 meses de edad, a esta edad e incluso a los 4 meses, no se observó disminución en la acumulación de los marcadores de célula β , como *Pdx1*, *Glut2*, *Nkx2.2* y *Nkx6.1* en los islotes de los ratones G6KO (Fig. 46). Sin embargo, sí se observaba una leve reducción del péptido-C en los islotes de los ratones G6KO en comparación con los ratones control. A los 6 meses de edad, se observa una disminución notable de los niveles de *Pdx1*, *Glut2*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *MafA* y péptido-C en los islotes de los ratones G6KO (Fig. 47).

Dado que la inactivación del gen *Gata6* ocurre en estadios embrionarios del páncreas, los defectos en la homeostasis de la glucosa observado en los ratones G6KO pudieran reflejar defectos durante el desarrollo de la célula β . Para analizar la contribución de GATA6 en células β adultas, sería necesario inactivar GATA6 exclusivamente en este tipo celular y en este estadio. Teniendo en cuenta que no existen líneas Cre eficientes para este propósito, se ha utilizado una estrategia basada en infecciones con adenovirus que expresa la recombinasa Cre de forma constitutiva (Ad-Cre) de islotes de ratones *Gata6*^{flox/flox} de 2 meses de edad. La eficiente escisión de los sitios *LoxP* del gen *Gata6* fue

comprobada midiendo los niveles de ARNm del gen *Gata6* por qPCR. A pesar de una eficiente inactivación de *Gata6*, la expresión de genes clave en las células β , como *Ins2*, *Pdx1* o *Nkx2.2*, no se vio afectada por la delección de *Gata6* (Fig. 48A). De forma similar, la inactivación de GATA6 en islotes humanos aislados usando un siRNA específico para este gen, no produjo una disminución significativa en los niveles de expresión de *Ins2* (Fig. 48B). Las diferencias obtenidas en el modelo de *knockout* condicional y los ensayos de inactivación en islotes adultos *in vitro* pudieran reflejar el requerimiento de GATA6 durante el desarrollo embrionario y en la maduración de la célula β o bien simplemente se deba a las limitaciones técnicas del estudio *in vitro* (véase Discusión).

4. GATA6 es un regulador directo de la expresión de *Pdx1* en las células β adultas

Hasta la fecha no se conocen dianas directas de GATA6 en el islote pancreático adulto. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron la regulación directa de *Pdx1* durante el desarrollo embrionario por factores GATA mediante análisis de transgénesis. En estos estudios se generaron ratones transgénicos que contenían 5 kb del promotor del gen *Pdx1*, que recapitulaba la expresión endógena de *Pdx1*. Esta región contiene dos sitios GATA conservados en el área III de la secuencia reguladora de *Pdx1* (Carrasco *et al.*, 2012).

Se conoce que *Pdx1* es un regulador de la función de la célula β y un regulador directo de la expresión del gen de la insulina (Iype *et al.*, 2005; Spaeth *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019), y para determinar si GATA6 regula la expresión de *Pdx1*, a través de los sitios GATA previamente identificados, se realizó un análisis de los ratones transgénicos en estadios adultos.

Los ratones *Pdx1*-wt-*LacZ* utilizados, contienen las secuencias silvestres del promotor *Pdx1* fusionadas al gen reportero *LacZ*. Como se observa en la Fig. 49, la expresión del gen *LacZ*, detectada mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti- β -galactosidasa, solapa completamente con la expresión endógena de *Pdx1* en los islotes de los ratones de 11 semanas y de 6 meses de edad, de tres líneas transgénicas *Pdx1*-wt-*LacZ* independientes.

En ratones transgénicos de 11 semanas que llevan la construcción con los sitios GATA mutados, *Pdx1*-mut-*LacZ*, la expresión de la β -galactosidasa en el islote coincide con la expresión endógena de *Pdx1*, y fue similar al patrón de expresión de *Pdx1* en dos líneas transgénicas independientes.

Sin embargo, en los ratones *Pdx1*-mut-*lacZ* de 6 meses de edad se observó una disminución drástica en la expresión de β -galactosidasa en el islote, donde sólo se observaron algunas células positivas para β -galactosidasa en el dominio de expresión de *Pdx1*.

Dado que el único factor de transcripción GATA que se expresa en la célula β es GATA6 (Lentjes *et al.*, 2016; Tiyafoonchai *et al.*, 2017; Tremblay, Sanchez-Ferras and Bouchard,

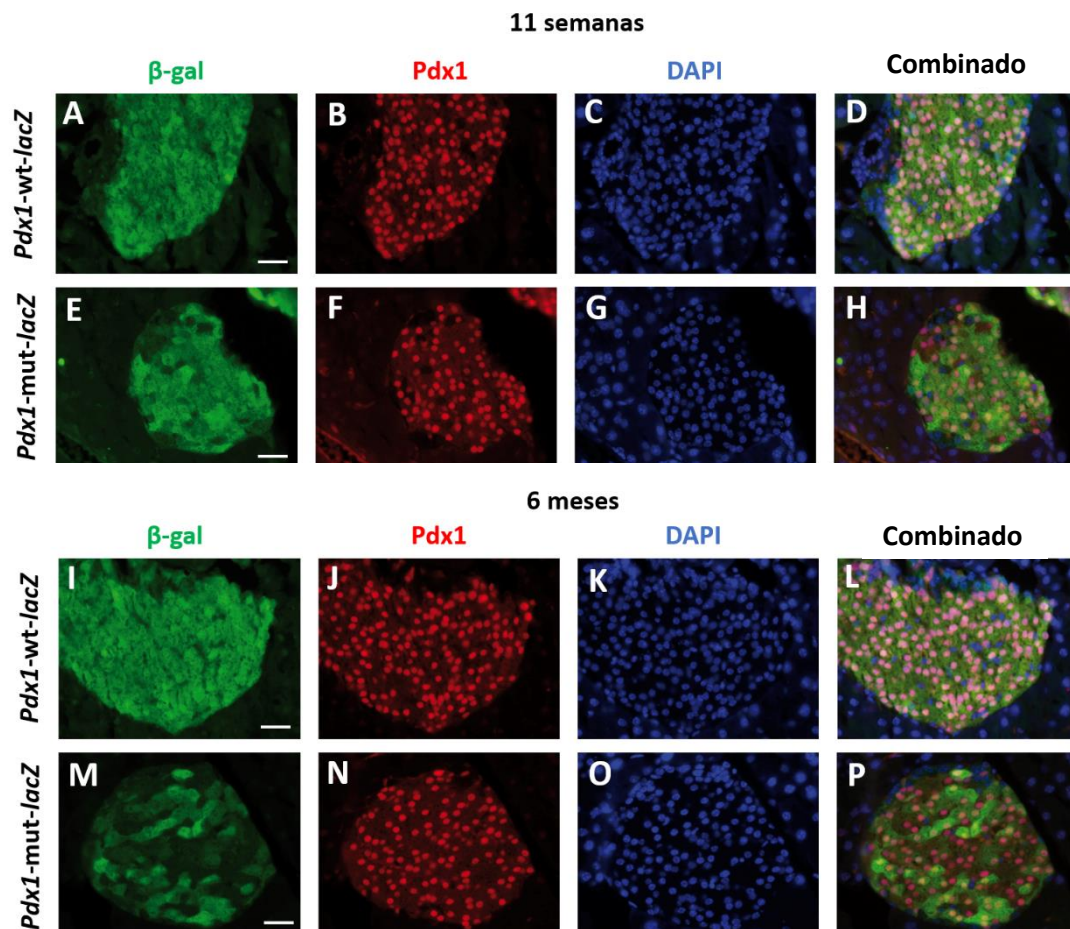


Figura 49. GATA6 regula la expresión de *Pdx1* en los islotes adultos. Los análisis de inmunofluorescencia de las secciones de tejido pancreático a las 11 semanas (A-H) y 6 meses de edad (I-P) de los ratones *Pdx1*-wt-*LacZ* muestran el completo solapamiento en la expresión de la β -galactosidasa con la expresión endógena de *Pdx1*. E-H: el patrón de expresión de la β -galactosidasa en los islotes de los ratones *Pdx1*-mut-*LacZ* es bastante similar a la expresión endógena de *Pdx1* a los 2 meses de edad. M-P: sin embargo, tan solo unas cuantas células positivas para *Pdx1* expresan la β -galactosidasa en los islotes de los ratones *Pdx1*-mut-*LacZ* a los 6 meses de edad. Barra de escala: 25 μ m.

2018), estos resultados indican que el factor de transcripción GATA6 directamente regulan la expresión de *Pdx1* en los islotes adultos a través de los sitios GATA presentes en el área III de la región *cis*-reguladora de *Pdx1*.

5. Análisis de las rutas alteradas en los islotes deficientes en *Gata6*

Ingenuity Canonical Pathways	FoldChange (linear) (KO vs. WT)	p-value	Gene	
EIF2 Signaling	6.57	0.03232	Snord2; Eif4a2	small nucleolar RNA, C/D box 2; eukaryotic translation initiation factor 4A2
	9.36	0.003445	Snora81; Eif4a2	small nucleolar RNA, H/ACA box 81; eukaryotic translation initiation factor 4A2
	5.28	0.044052	Rps12	ribosomal protein S12
	3.35	0.000503	Snora28; Eif5	small nucleolar RNA, H/ACA box 28; eukaryotic translation initiation factor 5
	2.61	0.001824	Eif3j2	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J2
mTOR Signaling	5.28	0.044052	Rps12	ribosomal protein S12
	2.19	0.01341	Rps3a2	ribosomal protein S3A2
	1.62	0.001904	Rras2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
	-4.71	0.013651	Rps6ka2	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 2
	-5.17	0.036868	Mapk3	mitogen-activated protein kinase 3
Oxidative Phosphorylation	-6.94	0.034369	Cox6a2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2
	-2.08	0.007571	Cox8a	cytochrome c oxidase subunit VIIa
	-2.43	0.001604	Atp5g2	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C2 (subunit 9)
	-2.31	0.006422	Cox6a1	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1
	-2.06	0.00677	Ndufs7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7
Mitochondrial Dysfunction	-1.55	0.007269	Atp5d	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit
	-6.94	0.034369	Cox6a2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2
	-5.84	0.018369	Cyp4f39	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 39
	-2.15	0.004966	Slc25a22	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, glutamate), member 22
	-2.08	0.027337	Slc25a12	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12
Insulin Receptor Signaling	-2.06	0.00677	Ndufs7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7
	-5.17	0.036868	Mapk3	mitogen-activated protein kinase 3
	-4.18	0.041003	Irs2	insulin receptor substrate 2
	-2.7	0.038823	Prkaca	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha
	-1.98	0.031538	Gsk3a	glycogen synthase kinase 3 alpha
Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) Signaling	-1.89	0.022426	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3
	-1.64	0.049173	Foxo1	forkhead box O1
	-10.77	0.025622	Slc2a2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
	-2.44	0.048247	Ins1	insulin I
	-2.28	0.025052	Pdx1	pancreatic and duodenal homeobox 1
	-1.72	0.021066	Foxa2	forkhead box A2
	-1.31	0.005667	Hnf4a	hepatic nuclear factor 4, alpha

Tabla 2. Lista de las vías de señalización afectadas y selección de genes que se expresan diferencialmente en los islotes de los ratones *G6KO* (KO) en comparación con los islotes aislados de los ratones control (WT) a los 2 meses de edad obtenida mediante el análisis de los datos del *microarray* utilizando el *software* “Ingenuity Pathway Analysis”.

Para tratar de identificar las posibles rutas afectadas en islotes deficientes en GATA6, se realizó un análisis a partir de los datos del *microarray* utilizando el *software* “Ingenuity Pathway Analysis”. En consonancia con los resultados previamente mostrados, en los islotes de los ratones *G6KO* se encontraron afectadas las rutas relacionadas con la insulina y la función de la célula β , implicadas en “*Maturity-onset diabetes of the Young*” (diabetes instaurada en jóvenes con patrón de diabetes en adultos) (MODY) (*Slc2a2*, *Pdx1*, *Ins1*, *Foxa2* y *Hnf4a*) y en la señalización del receptor de la insulina (*Irs2*, *Foxo1*, etc.) (Tabla 2).

Otra ruta de señalización que está alterada en los islotes de los ratones *G6KO*, observados en los resultados del análisis del *microarray*, están relacionadas con la disfunción mitocondrial. Se observó una bajada en genes involucrados en la función mitocondrial, incluyendo componentes de la cadena respiratoria (*Cox6a2* y *Cyp4f39*) y transportadores mitocondriales (*Slc25a12* y *Slc25a22*). Otras rutas afectadas en ausencia de actividad GATA6 en la célula β fueron la fosforilación oxidativa y la ruta mTOR. De hecho, recientemente se ha propuesto una conexión entre la disfunción mitocondrial y defectos en la función de las células β (Lu *et al.*, 2010; Supale *et al.*, 2012).

6. Las células β deficientes en *Gata6* presentan alteraciones ultraestructurales del retículo endoplásmico y de las mitocondrias

El análisis de las rutas afectadas en islotes deficientes en GATA6 indican que las células β pudieran estar en estado de estrés mitocondrial y de estrés en el retículo endoplasmático (RE). Durante estos procesos de estrés, estos orgánulos suelen tener cambios en su morfología. Para analizar la ultraestructura de las mitocondrias y el RE de las células β en ausencia de GATA6 realizamos experimentos de microscopía electrónica (MET) en islotes aislados de ratones *G6KO* y ratones control de 6 meses de edad.

En estos análisis se observó las crestas mitocondrias de las células β de los ratones control bien organizadas y condensadas. Sin embargo, las mitocondrias de las células β de los ratones *G6KO* presentaban crestas poco densas y definidas y tenían una apariencia hinchada, indicativo de respuesta al estrés (Fig. 50).

De forma similar, el análisis mediante MET reveló anomalías estructurales en el retículo endoplasmático en ausencia de GATA6, con apariencia distendida. Como se observa en la Fig. 50, las cisternas del retículo endoplasmático de las células β de los ratones control están bien alineadas mientras que en el RE de las células β de los ratones *G6KO* están desorganizadas.

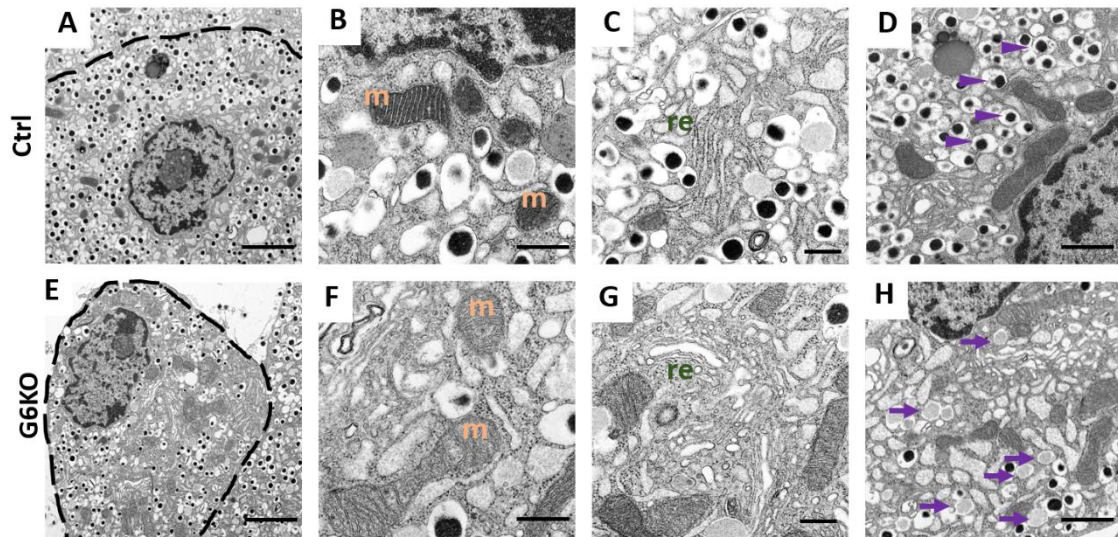


Figura 50. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) de las células β de islotes aislados de los ratones *G6KO* (E-H) y control (A-D) a los 6 meses de edad. Menor aumento de las imágenes de MET de las células β de los islotes de los ratones Ctrl (A) y *G6KO* (E). Las mitocondrias (m) de las células β de los ratones *G6KO* están hinchadas y presentan crestas desorganizadas (F) comparadas con las mitocondrias con morfología normal de las células β de los ratones Ctrl (B). Las cisternas del retículo endoplásmico (re) de las células β de los islotes deficientes para *Gata6* están distendidas y desorganizadas (G) en comparación con las células β de los islotes de los ratones Ctrl (C). Los gránulos densos (señaladas con puntas de flecha) disminuyen en las células β de los ratones *G6KO* (H) en comparación con las células β Ctrl (D). El número de gránulos de secreción inmaduros es mayor en las células β deficientes para *Gata6* (señalados con flechas) (H). Barra de escala: 2 μ m en A y E, 500 nm en B, C, F y G, 1 μ m en D y H.

Varios estudios han relacionado la disfunción mitocondrial y el estrés del RE con la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*) (J. W. Lee *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2012), por lo que se comprobó la acumulación de la proteína y se midieron los niveles de expresión de la *iNOS*, mediante inmunofluorescencia y qPCR, respectivamente, de los islotes pancreáticos de ratones controles y *G6KO*. A los 2 meses de edad se observó un aumento en la expresión y un leve aumento en la acumulación de *iNOS* en los islotes pancreáticos de los ratones *G6KO*. En ratones de 6 meses de edad, la acumulación de *iNOS* en los islotes de ratones *G6KO* presentó un drástico aumento comparados con los ratones control (Fig. 51).

El análisis de TEM de las células β también nos permitió realizar un estudio de los gránulos de insulina. Los gránulos de secreción de insulina de las células β son fácilmente distinguibles por la presencia de un núcleo denso y un halo translúcido, indicativo de que los gránulos de secreción están maduros.

La cuantificación de gránulos de insulina maduros mostró una reducción significativa de éstos en las células β de islotes deficientes en GATA6 comparados con los islotes control (Fig. 52). En las imágenes TEM también se observan vesículas secretoras con un núcleo gris, correspondiente a la insulina inmadura, sin procesar. A pesar de que existe un aumento del número de gránulos de secreción inmaduros en los islotes *G6KO* comparados con el control (Fig. 52B), a primera vista, el procesamiento de la insulina parece no estar afectado, ya que no existen diferencias significativas entre los niveles de la ratio proinsulina/insulina circulante medida en plasma entre los ratones control y los ratones *G6KO*.

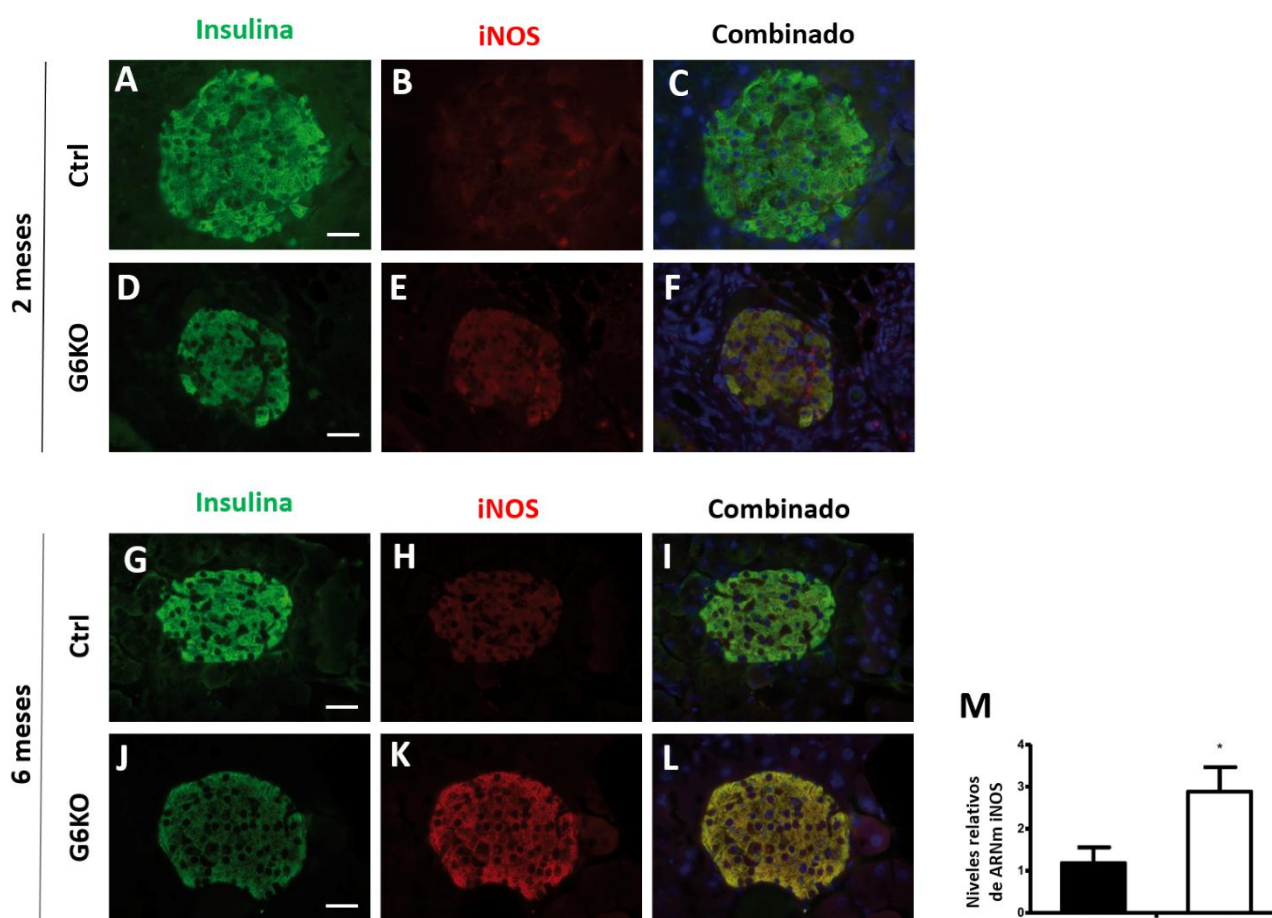


Figura 51. Acumulación de iNOS en las células β deficientes para *Gata6*. Los análisis de inmunofluorescencia muestran la acumulación de iNOS en los islotes de los ratones *G6KO* a los 2 meses (E) y a los 6 meses de edad (K) en comparación con los islotes de los ratones Ctrl (B y H). Barra de escala: 25 μ m. **M:** Gráfica del análisis de qPCR de la expresión de iNOS de los islotes aislados de los ratones Ctrl y *G6KO* a los 6 meses de edad ($n = 10$ ratones). Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

Las imágenes TEM también mostraron la existencia de un gran número de gránulos vacíos, sin la presencia de núcleo denso en las células β de los islotes *G6KO* (Fig. 50).

Tanto los gránulos de insulina vacíos como el número de total de gránulos de insulina por área estaban significativamente disminuidos en los islotes *G6KO* comparados con islotes control (Fig. 52B).

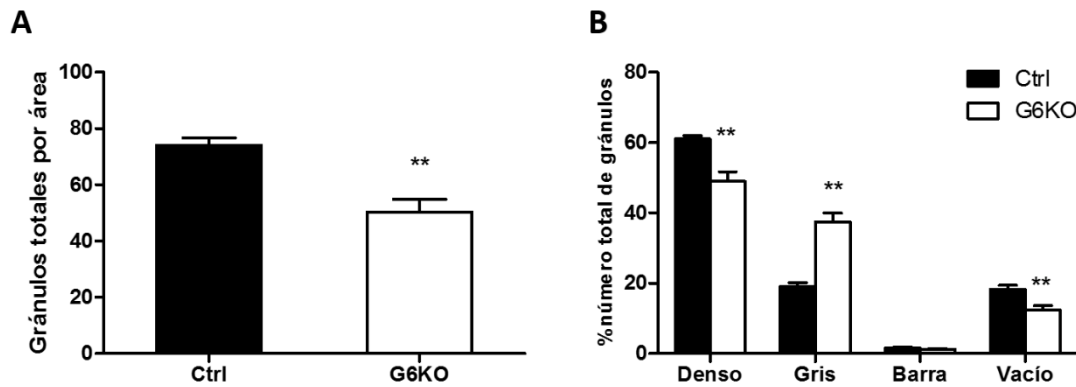


Figura 52. **A:** Cuantificación total de gránulos secretores de insulina de las imágenes MET. **B:** Cuantificación de gránulos secretores de insulina de acuerdo con la apariencia del núcleo del gránulo: denso, gris, barra o vacío. $n=20$ imágenes de MET obtenidas a partir de los islotes aislados de 6 ratones *Gata6 flox/flox* y *G6KO*, utilizando el programa ImageJ. Los valores de muestran como la media \pm SEM. ** $P \leq 0,01$.

Por lo tanto, estos resultados indican que GATA6 es necesario para preservar la integridad del RE y de las mitocondrias, así como para la formación de las vesículas de secreción de insulina en las células β .

PARTE B. Contribución de GATA4 a la diferenciación e identidad de las células del epitelio glandular del estómago

1. Defectos morfológicos del epitelio gástrico en ausencia de GATA4

Para esclarecer el papel que juega el factor de transcripción GATA4 en el desarrollo del epitelio gástrico glandular, se cruzó la línea de ratón *Gata4*^{flox/flox} con la línea de ratones transgénica que expresa la recombinasa Cre bajo el control de *Pdx1* (ratones *Pdx1-Cre*) (Hingorani *et al.*, 2003). Como se describió en Carrasco, et al. 2012 y Xuan, et al. 2012, la inactivación de *Gata4* en los progenitores pancreáticos en el dominio *Pdx1* no afecta al desarrollo pancreático y los ratones *Gata4*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* (de ahora en adelante, *G4KO*) nacían con una herencia mendeliana normal. Sin embargo, *Gata4* también se expresa en la región distal del epitelio glandular gástrico y en la parte proximal del duodeno, donde solapa con la expresión de *Pdx1* (Fig. 53).

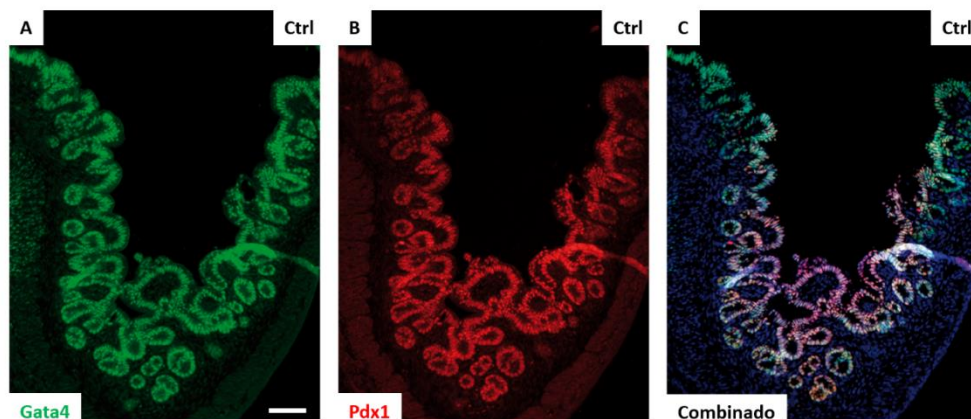


Figura 53. Patrón de expresión de *Gata4* y *Pdx1* en el epitelio glandular gástrico. El análisis de inmunofluorescencia en ratones a P1 muestra la expresión de GATA4 en el epitelio glandular del estómago (A) que solapa su expresión con PDX1 (B) en la región del *antrum* (C). Barra de escala: 100 μ m.

Mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se comprobó la eficiencia en la escisión de los sitios *LoxP* de *Gata4* por la recombinasa Cre en el epitelio glandular gástrico de los ratones *G4KO* un día después de su nacimiento (P1). La figura 54 muestra la ausencia de proteína GATA4 en el epitelio glandular de los ratones *G4KO*. El trazado de linaje usando la línea *Rosa26R-eYFP* cruzada con la línea *Pdx1-Cre* (Ctrl) y

Gata4^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* (*G4KO*) muestra que el *antrum* del estómago, tanto de los ratones control como de los ratones *G4KO*, muestra células positivas para GFP. Sin embargo, también se observan en forma de mosaico células positivas para GFP en el corpus del estómago (Fig. 55).

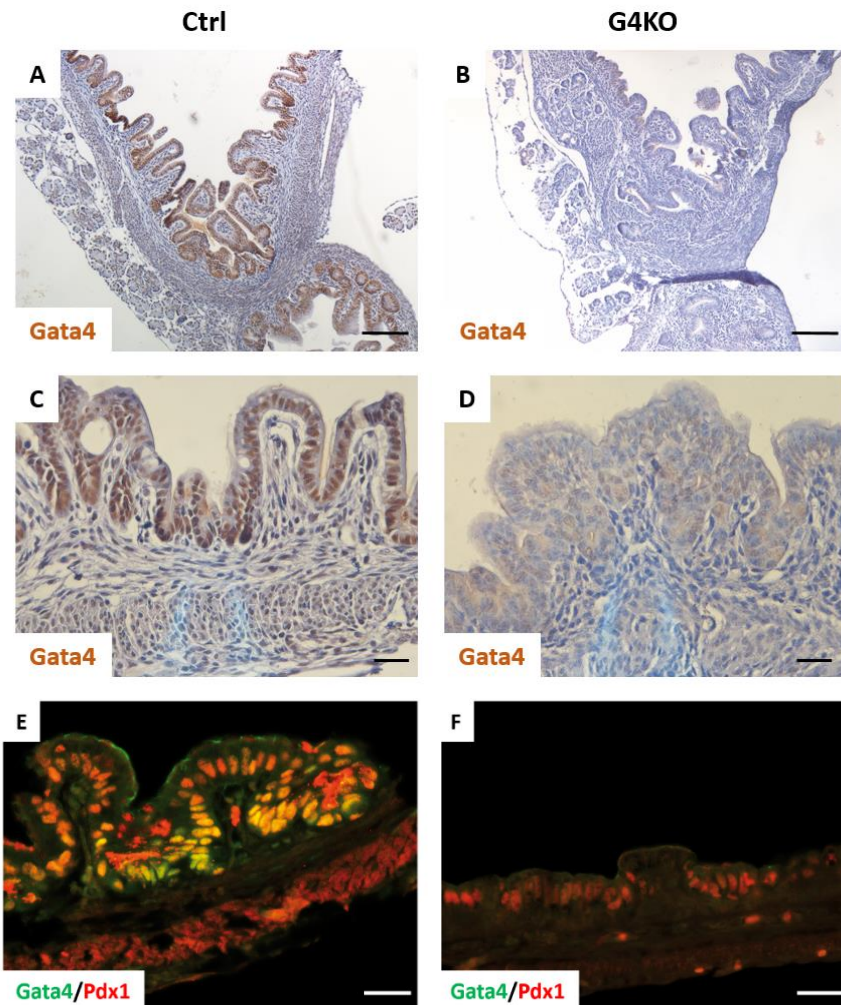


Figura 54. Inactivación de *Gata4* en el *antrum* del estómago utilizando la línea *Pdx1-Cre*. Los análisis de inmunohistoquímica (A-D) y de inmunofluorescencia (E y F) muestran una eficiente inactivación del alelo *floxeado* *Gata4* mediante la recombinasa Cre en los ratones *G4KO* con ausencia de la proteína GATA4 en el epitelio del *antrum* (B, D y F) en comparación con los ratones control (A, C y E) a P1. Barra de escala: (A y B):100 μ m; (C-F): 25 μ m.

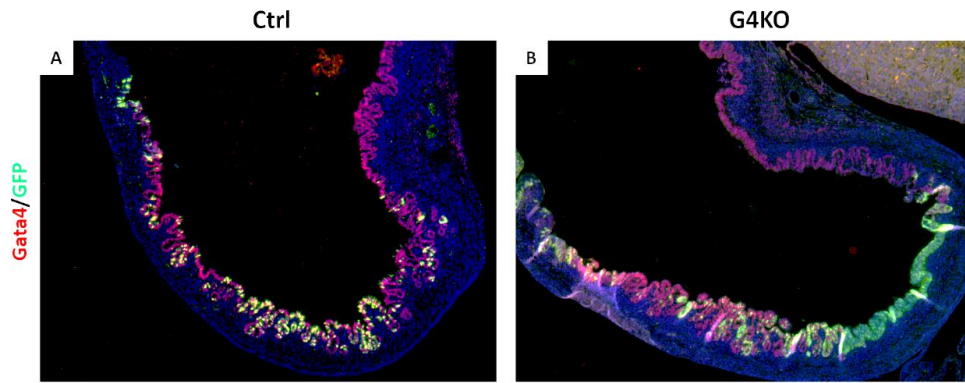


Figura 55. Inmunodetección del gen reportero *YFP* en el epitelio gástrico glandular. Los análisis de inmunofluorescencia del epitelio glandular de los ratones *Gata4*^{flox/flox}; *eYFP/eYFP*; *Pdx1-Cre* (*G4KO*) (B) y *eYFP/eYFP*; *Pdx1-Cre* (Ctrl) (A) a E17.5 revelan que el marcaje para GFP se extiende desde la región del *antrum* hasta el epitelio glandular del *corpus*. Barra de escala: 100 μm.

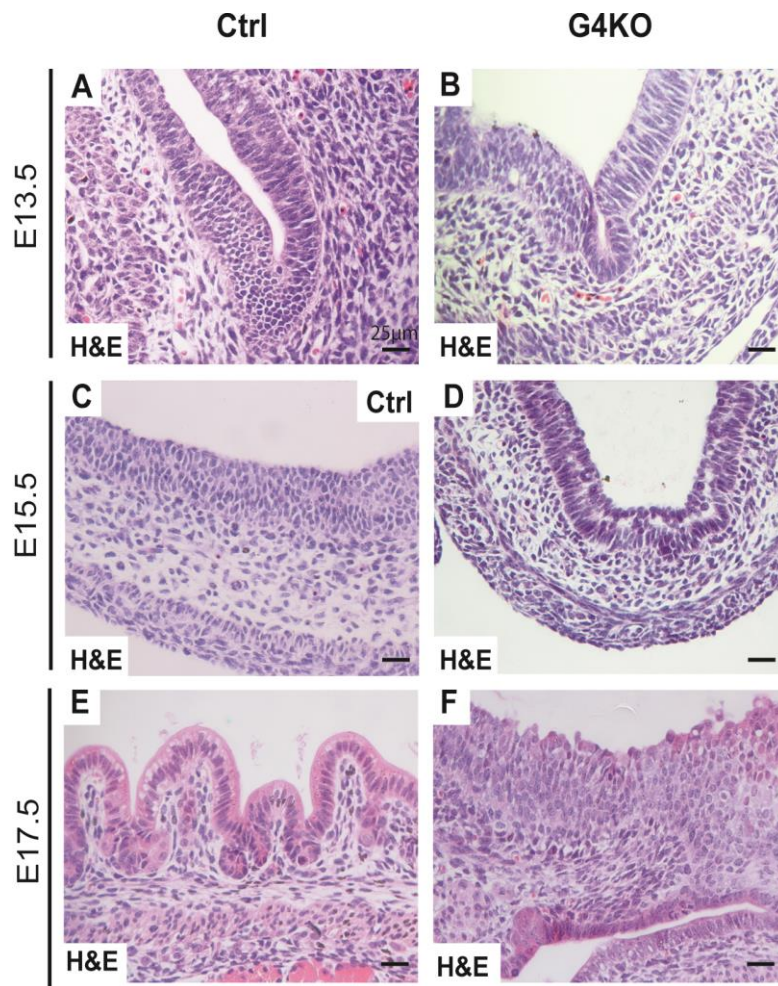


Figura 56. Análisis histológico del epitelio glandular. Las secciones del epitelio gástrico glandular teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de los ratones control (Ctrl) y *G4KO* a estadio E13.5 (A, B) y E15.5 (C, D) no muestran anomalías en la morfología del epitelio de los ratones *G4KO*. Sin embargo, a E17.5 en los ratones control se forman las glándulas gástricas (E) mientras que en el ratón *G4KO* (F) no se forman las glándulas y el epitelio tiene una apariencia plana. Barra de escala: 25 μm.

Usando este modelo de ratón, investigamos el papel de GATA4 en el correcto desarrollo y maduración de las unidades gástricas del epitelio gástrico glandular. Para ello se analizó la morfología del epitelio del estómago posterior de los ratones *G4KO* a diferentes estadios de desarrollo. El análisis mediante tinciones con H&E de secciones histológicas de estómagos no revelaron diferencias apreciables en la morfología del epitelio glandular (*antrum*) entre los ratones control y los ratones *G4KO* a estadios embrionarios (E) 13.5 y E15.5. Sin embargo, en el estadio E17.5, cuando ocurre la transición del epitelio gástrico de pseudoestratificado a columnar, se evidenciaron defectos en la formación de las unidades gástricas en los ratones *G4KO*, a diferencia de

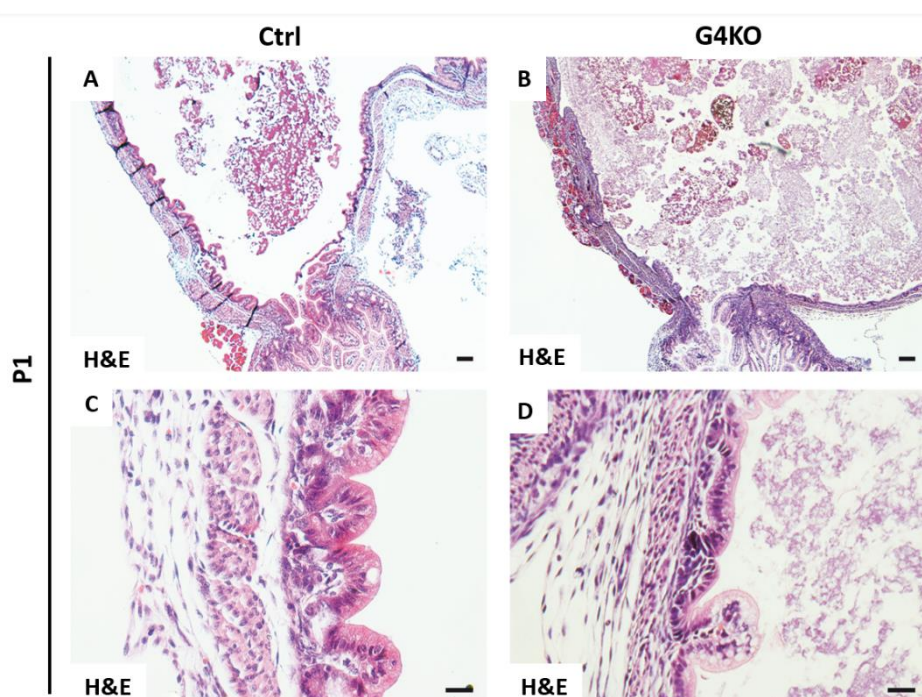


Figura 57. El epitelio glandular de los ratones deficientes en *Gata4* presenta una morfología anormal. Las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de los ratones a día postnatal 1 (P1) muestran que el epitelio del *antrum* de los ratones *G4KO* aparece aplanado y sin glándulas gástricas (B y D), en contraste con el epitelio del *antrum* de los ratones control (A y C) formado por glándulas gástricas. Barra de escala: (A y B):100 μm; (C y D): 25 μm.

los ratones control (Fig. 56). En el epitelio glandular de los ratones *G4KO* a P1, presentaba regiones con epitelio plano sin formación de glándulas, a diferencia de los ratones control, donde se apreciaban invaginaciones formando las glándulas gástricas (Fig. 57). En estadios adultos los ratones control presentaban un epitelio glandular bien definido y organizado, sin embargo, el epitelio del *antrum* de los ratones *G4KO* mostraba una morfología atípica, similar al epitelio córneo y escamoso del epitelio gástrico

anterior (*fundus*). Además, una red de ductos epiteliales que invadían la capa submucosa del estómago se observó en los ratones *G4KO* (Fig. 58).

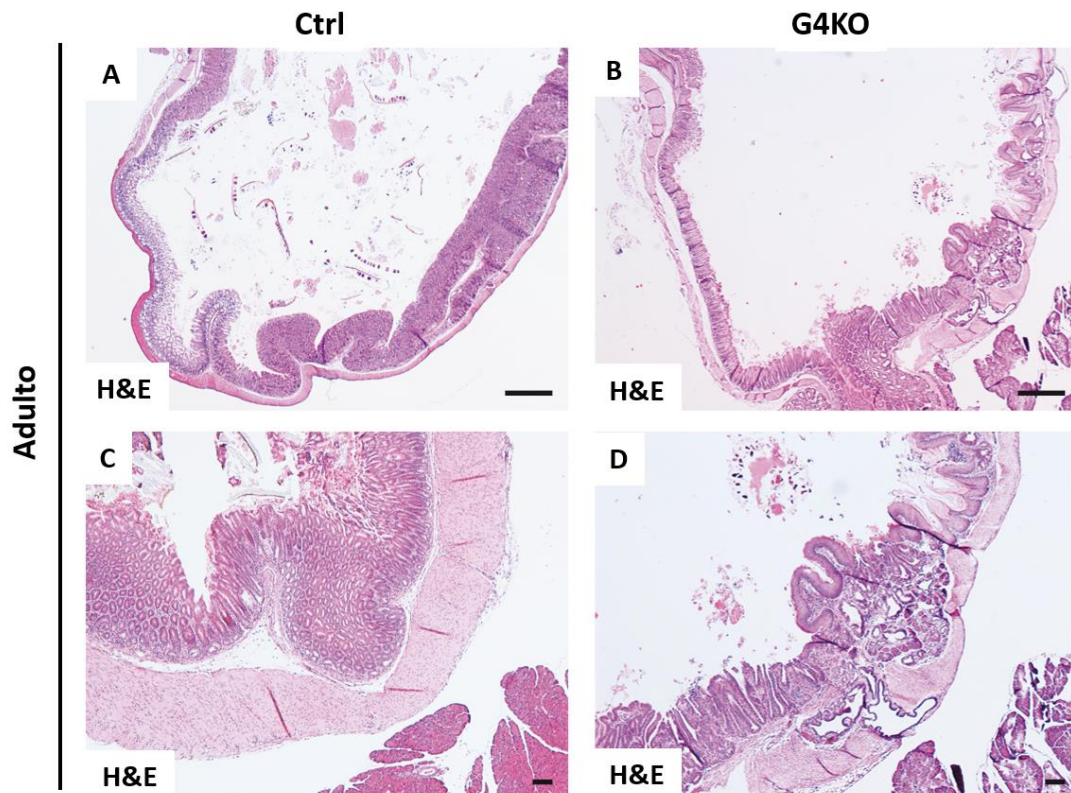


Figura 58. El epitelio glandular de los ratones deficientes en *Gata4* presenta una morfología anormal. Las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de los ratones adultos muestran que el epitelio del *antrum* de los ratones *G4KO* presenta una morfología del epitelio glandular anormal compuesto por células epiteliales con apariencia queratinizada (**B y D**), en contraste con el epitelio del *antrum* de los ratones control (**A y C**) que presenta una buena organización de las glándulas gástricas. Barra de escala: (A y B): 500 μm ; (C y D): 100 μm .

2. GATA4 es esencial para el mantenimiento del límite anteroposterior del epitelio gástrico

En el epitelio gástrico de los ratones control se observa un claro límite entre el epitelio del estómago anterior y posterior, como se observó en los análisis inmunofluorescencias para marcadores característicos del epitelio escamoso del *fundus*, como la citoqueratina

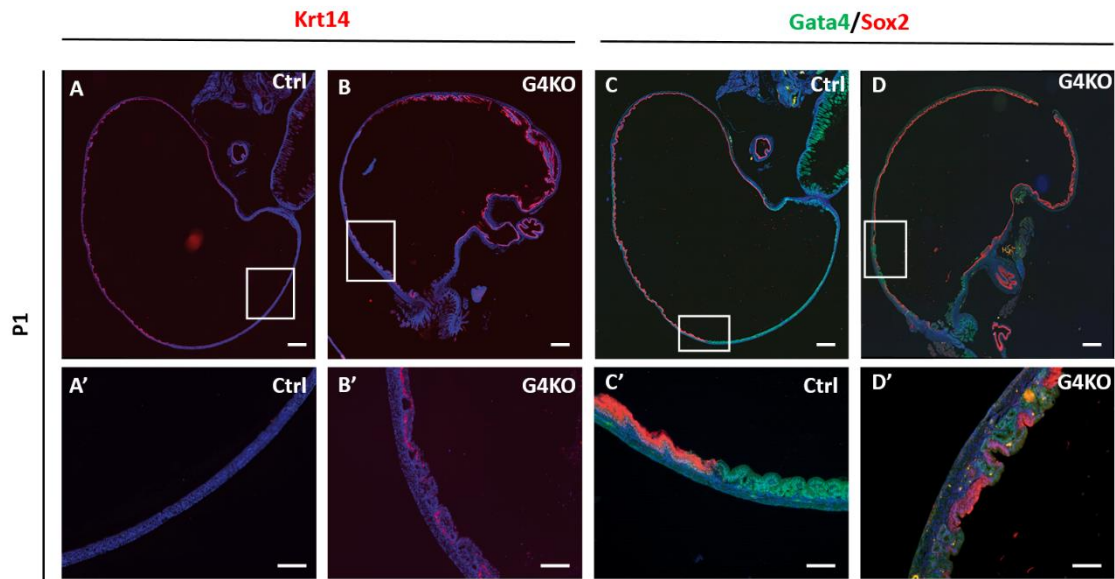


Figura 59. En ausencia de GATA4 se pierde el límite escamocolumnar. Las inmunofluorescencias para citoqueratina 14 (Krt14) muestran el límite entre el *forestomach* y el *hindstomach* en los ratones control a P1 (**A, A'**). Los ratones *G4KO* pierden el límite escamocolumnar, como se observa en la expresión de la citoqueratina 14 que se extiende hacia el dominio del *antrum* (**B, B'**). La expresión de *Sox2* está restringida al epitelio escamoso y *Gata4* se expresa exclusivamente en el epitelio columnar del *antrum* (**C, C'**) en los ratones control. Sin embargo, en los ratones *G4KO*, la inmunodetección de SOX2 se observa en el *forestomach* y en el *hindstomach* (**D, D'**). Barra de escala: (A-D): 500 μ m; (A'-D'): 100 μ m.

14, en recién nacidos y adultos (Fig. 59 y 60). De forma similar, la expresión de *Sox2* se observó exclusivamente en el *fundus* de los ratones recién nacidos y adultos, pero no en el *corpus* y el *antrum*. Sin embargo, estos análisis de inmunodetección para citoqueratina 14 y para SOX2 en los ratones *G4KO* mostraron un marcaje desde el *fundus* hasta el epitelio del *antrum*. Aquellas regiones del *antrum* *Gata4*⁺ y por lo tanto que habían escapado de la escisión por la recombinasa Cre eran negativas para citoqueratina 14 y SOX2. Estos resultados indican que existe una pérdida del límite entre el epitelio escamoso y córneo del *fundus* y el epitelio glandular del *antrum* y por lo tanto una anteriorización del antrum en ausencia de GATA4.

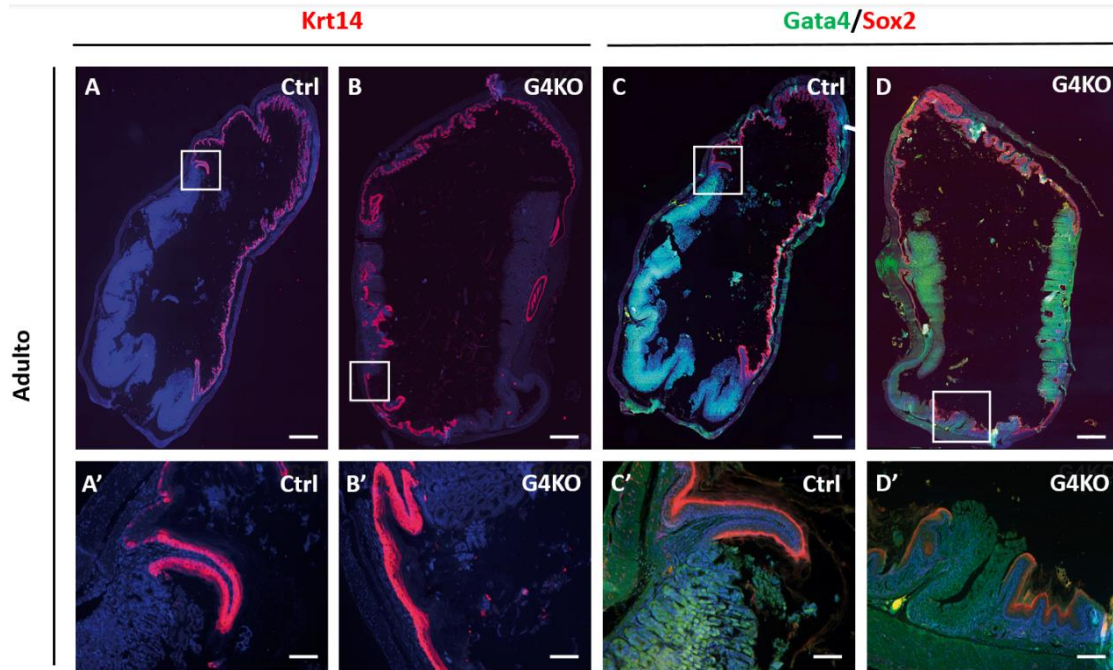


Figura 60. GATA4 mantienen la identidad celular del epitelio glandular gástrico. Las inmunofluorescencias para citoqueratina 14 (Krt14) en los ratones adultos control muestran el claro límite entre el *forestomach* y el *hindstomach* (A, A'). Al igual que lo observado a P1, los ratones *G4KO* adultos pierden el límite escamocolumnar, como se observa en la expresión de la citoqueratina 14 que se extiende hacia el dominio del *antrum* (B, B'). La expresión de *Sox2* está restringida al epitelio escamoso y *Gata4* se expresa exclusivamente en el epitelio columnar del *antrum* (C, C') en los ratones control. Sin embargo, en los ratones *G4KO*, la inmunodetección de SOX2 se observa en el *forestomach* y en el *hindstomach* (D, D'). Barra de escala: (A-D): 500 μ m; (A'-D'): 100 μ m.

Para analizar en más detalle la capacidad de GATA4 de mantener la identidad celular del epitelio glandular, realizamos ensayos de inactivación de *Gata4* en la línea humana gástrica AGS. Esta línea celular tiene una alta expresión de *Gata4*. Para inactivar GATA4 en estas células se realizaron experimentos de transfección con un siRNA específico para *Gata4*. Esta estrategia permitió la inactivación de *Gata4* de forma eficiente como se observa tanto a nivel de proteína en los análisis de inmunofluorescencia como a nivel de ARNm mediante qPCR para *Gata4*, comparados con los realizados en células transfectadas con un siRNA no específico (*Stealth* siRNA). De forma similar a lo observado en el modelo de ratón *G4KO*, la inactivación de *Gata4* en las células AGS produjo un aumento en la acumulación de proteínas citoqueratina 14 y SOX2. El aumento de citoqueratina 14 en las células deficientes en GATA4 fue confirmado también a nivel transcripcional mediante qPCR. A pesar del observable aumento en la acumulación de proteína SOX2 en células *knockdown* para *Gata4*, no se observaron

diferencias en los niveles de transcritos de *Sox2* en células transfectadas con siRNA GATA4 comparadas con la transfectadas con siRNA control (Fig. 61).

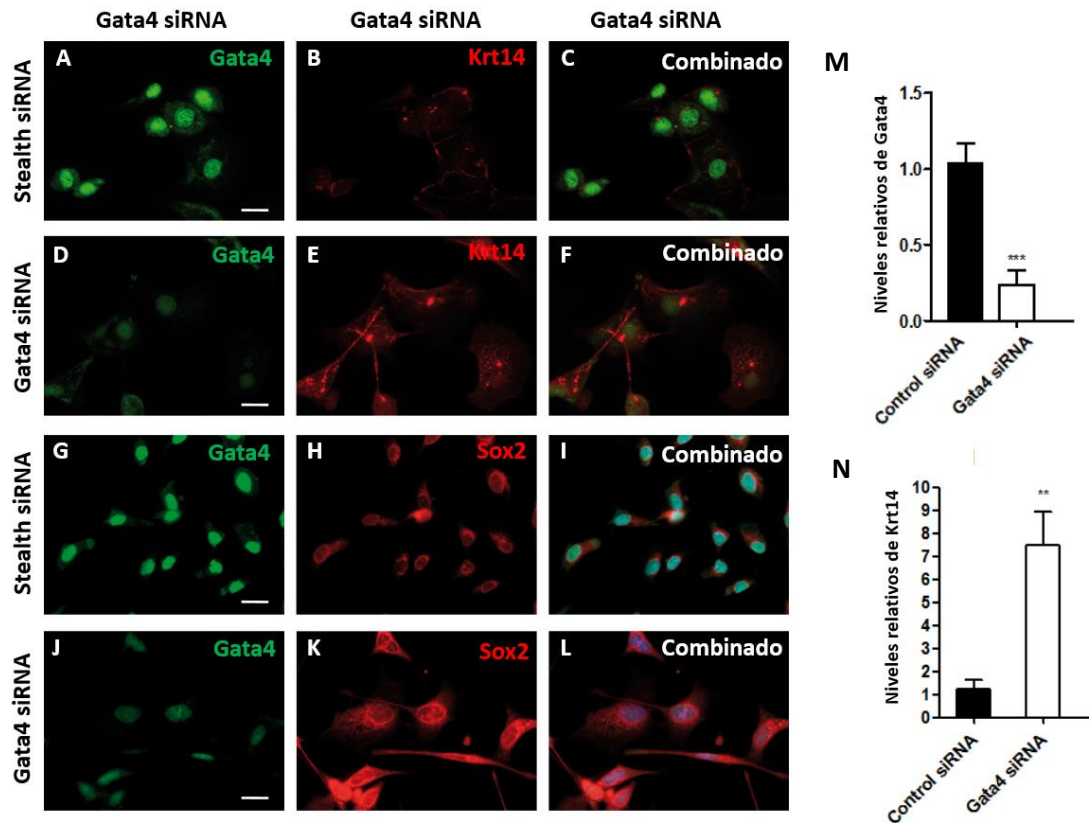


Figura 61. GATA4 mantiene la identidad de la línea celular gástrica humana AGS. Los análisis de inmunofluorescencia de la línea celular AGS transfectada con un siRNA específico para *Gata4* muestran la correcta inactivación de la expresión de *Gata4* (D, J, M) comparado con las células transfectadas con un siRNA control (*Stealth* siRNA) (A, G). La inactivación de *Gata4* en las células AGS induce la expresión de marcadores del epitelio escamoso como la citoqueratina 14 (E, F, N) y *Sox2* (K, L). (n= 6 experimentos independientes por condición experimental). Barra de escala: 100 μ m. ** $P \geq 0,01$, *** $P \geq 0,001$.

3. GATA4 es necesario para la diferenciación celular del epitelio gástrico glandular

Como se menciona en la Introducción, estudios previos en el análisis de ratones quiméricos para *Gata4*, han mostrado que las células GATA4⁻ del epitelio gástrico no se diferencian correctamente (Jacobsen *et al.*, 2002, 2005). Sin embargo, en estos estudios no se puede establecer si GATA4 juega un papel autónomo en el mantenimiento de la identidad celular del epitelio glandular, ya que señales aguas abajo de GATA4 en tejidos colindantes pudieran también afectar a la diferenciación del epitelio del estómago.

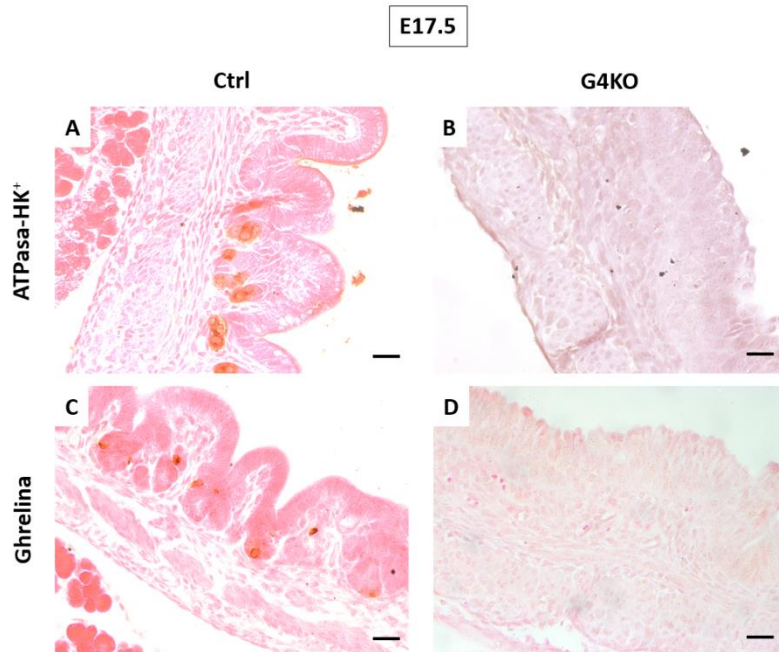


Figura 62. Los análisis de inmunohistoquímica muestran que las células parietales y las enteroendocrinas del epitelio glandular de los ratones control a E17.5 expresan ATPasa-HK⁺ (A) y ghrelina (C), respectivamente. Sin embargo, no se observan células positivas para ATPasa-HK⁺ (B) ni ghrelina (D) en el epitelio glandular de los ratones *G4KO*. Barra de escala: 25 μ m.

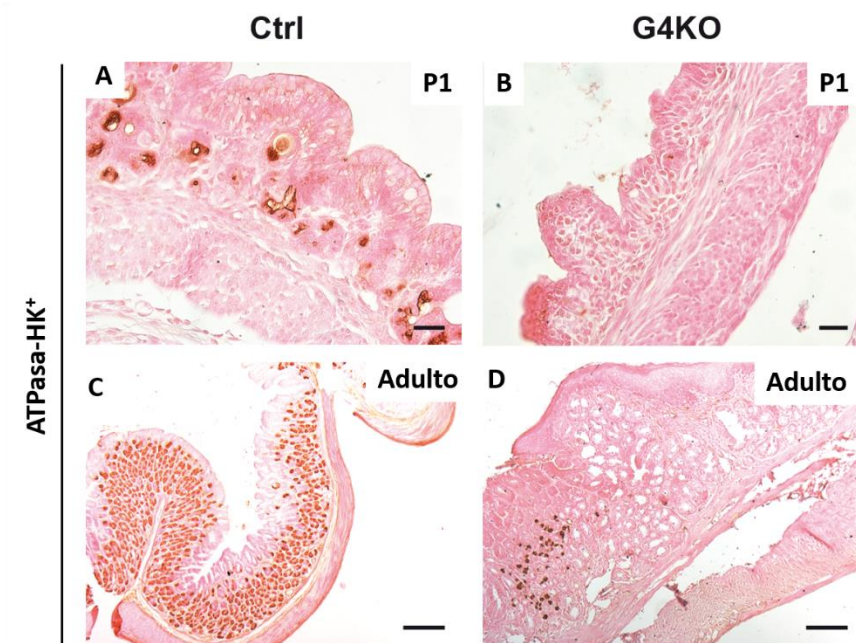


Figura 63. Defectos en la diferenciación celular en el epitelio glandular de los ratones deficientes en *Gata4*. Los análisis de inmunohistoquímica para ATPasa-HK⁺ de la región del epitelio gástrico glandular a estadio P1 y adulto muestran una disminución de este marcador en el epitelio de los ratones *G4KO*, revelando defectos en la diferenciación de las células parietales en los ratones *G4KO*. Barra de escala: (A, B): 25 μ m; (C, D): 100 μ m.

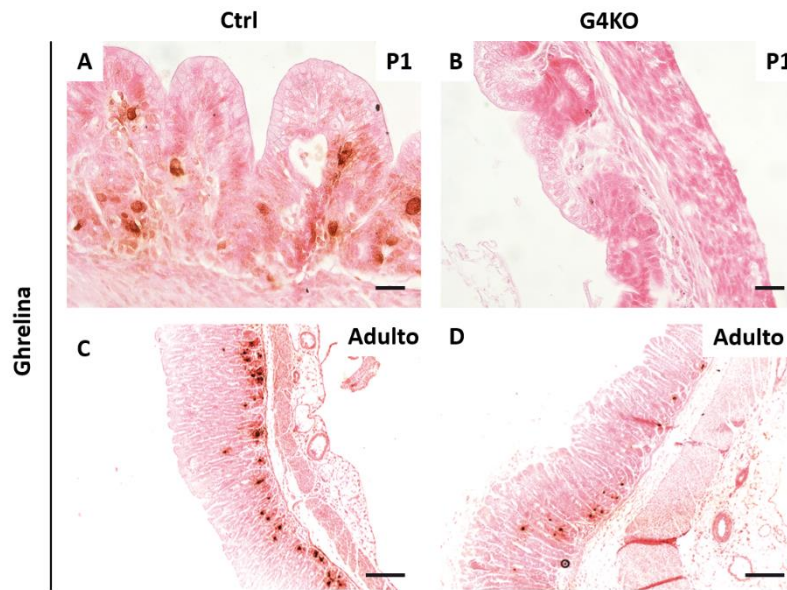


Figura 64. Defectos en la diferenciación celular en el epitelio glandular de los ratones deficientes en *Gata4*. Los análisis de inmunohistoquímica para ghrelina de la región del epitelio gástrico glandular a estadio P1 y adulto muestran una disminución de este marcador en el epitelio de los ratones *G4KO*, revelando defectos en la diferenciación de las células endocrinas en los ratones *G4KO*. Barra de escala: (A, B): 25 μ m; (C, D): 100 μ m.

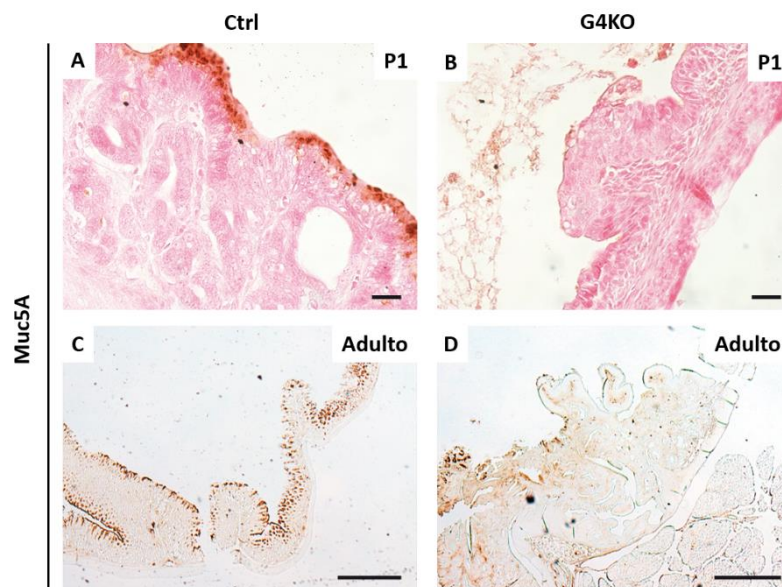


Figura 65. Defectos en la diferenciación celular en el epitelio glandular de los ratones deficientes en *Gata4*. Los análisis de inmunohistoquímica para Muc5A de la región del epitelio gástrico glandular a estadio P1 y adulto muestran una disminución de este marcador en el epitelio de los ratones *G4KO*, revelando defectos en la diferenciación de las células mucosas en los ratones *G4KO*. Barra de escala: (A, B): 25 μ m; (C, D): 100 μ m.

Para esclarecer el papel de GATA4 en la diferenciación y mantenimiento de la identidad celular del epitelio glandular se analizó mediante técnicas de inmunohistoquímica la expresión de marcadores de diferenciación de distintos tipos celulares gástricos el estómago de los ratones *G4KO* a diferentes estadios del desarrollo embrionario.

En las glándulas gástricas en desarrollo a E17.5 de los ratones control, las células parietales expresan la ATPasa de intercambio hidrógeno-potasio gástrica (ATPasa-HK⁺) y las células endocrinas son positivas para ghrelina. Sin embargo, en el epitelio glandular de los ratones *G4KO* a ese estadio, presentaban una morfología plana sin invaginaciones visibles ni glándulas secretoras. En el análisis de expresión de ATPasa-HK⁺ y de ghrelina del epitelio glandular gástrico de los ratones *G4KO* no se observaron células positivas para estos marcadores gástricos (Fig. 62).

A estadios postnatales y en ratones adultos controles, los cambios morfológicos que ocurren en el epitelio del estómago durante el desarrollo de las glándulas gástricas viene acompañado por la expresión de marcadores de diferenciación para los diferentes tipos celulares; las células parietales expresan ATPasa-HK⁺, las células G endocrinas la ghrelina y las células mucosas del cuello de la glándula secretan Mucina 5 (MUC5A). Sin embargo, el epitelio glandular de los ratones *G4KO* presentaba defectos en la diferenciación, ya que el número de células positivas para estos tres marcadores se vio reducido drásticamente, tanto a P1 como en adultos (Fig. 63, 64 y 65). Estos resultados indican que el factor de transcripción GATA4 juega un papel crítico y esencial en la citodiferenciación del epitelio gástrico glandular.

4. Formación de páncreas heterotópico en el estómago en ausencia de GATA4

Un estudio más detallado mediante técnicas de histología del epitelio gástrico de los ratones *G4KO* revelaron una invaginación del epitelio del *antrum* a E17.5 que ingresa dentro de la capa subserosa del estómago. Este epitelio invaginado formaba una estructura dilatada con apariencia de ducto a partir de la cual se originan células con morfología y apariencia similar a las acinares pancreáticas (Fig. 66).

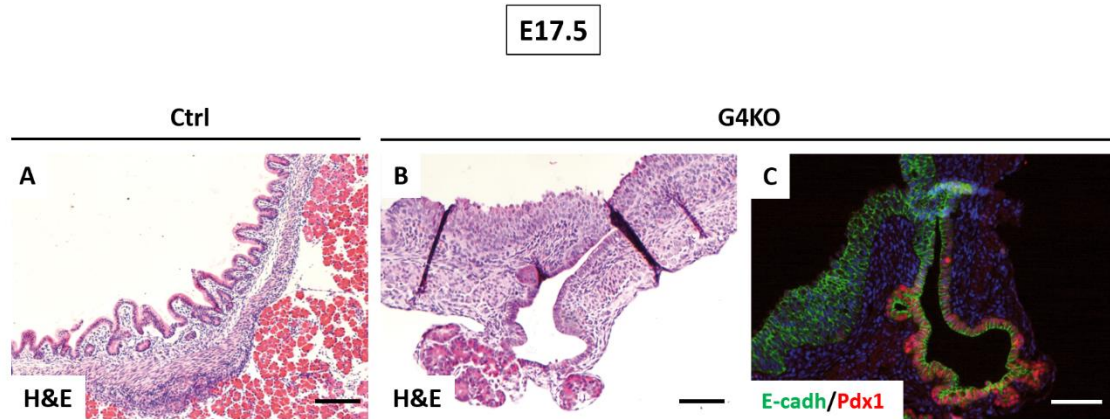


Figura 66. Las inmunohistoquímicas y tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) del epitelio gástrico glandular de los ratones *G4KO* a E17.5 revelaron la presencia de invaginaciones del epitelio del *antrum* en la capa subserosa del estómago formando una estructura similar a un ducto (B, C) ausente en el epitelio de los ratones control (A). Barra de escala: 100 μ m.

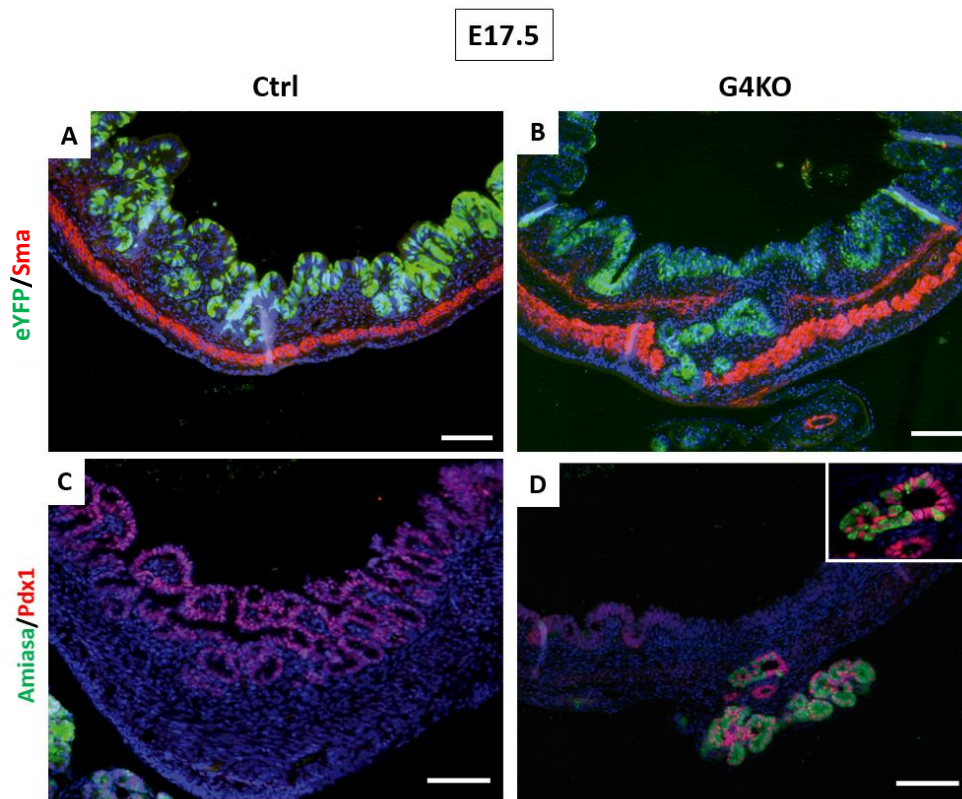


Figura 67. Las células marcadas con GFP en el tejido ectópico invaginado en los ratones *G4-eYFP-KO* (*G4KO*) (B) son continuas al epitelio glandular gástrico, penetra dentro de la submucosa y rompe la cama muscular marcada con α -actina del músculo liso. El tejido ectópico contiene células acinares bien diferenciadas que expresan amilasa (D). Barra de escala: 100 μ m.

Para poder visualizar mejor el tejido del páncreas ectópico se cruzaron los ratones *Gata4^{flox/flox}; Pdx1-Cre* con ratones *ROSA26R-eYFP*. En los ratones *G4-eYFP-KO* las células

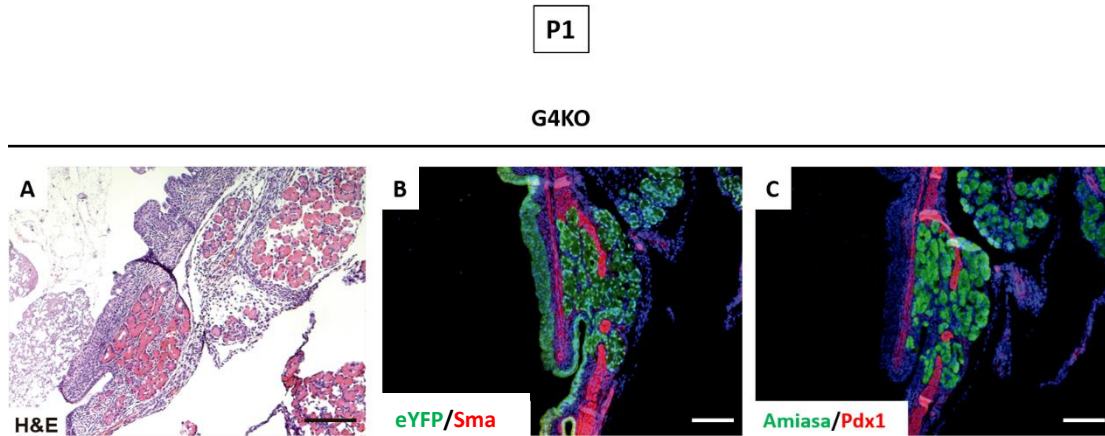


Figura 68. A estadio P1 se observa con mayor claridad la presencia de un tejido pancreático ectópico mediante la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) (A) en los ratones *G4KO*, además de la interrupción de la capa muscular marcada con α -actina del músculo liso (B, C) y toda la masa de tejido pancreático ectópico es positivo para el marcador acinar amilasa (C). Barra de escala: 100 μ m.

positivas para YFP localizadas en el epitelio glandular aparecían de forma continua con las células invaginadas dentro de la capa subserosa rompiendo la capa muscular (Fig. 67). Estas células ductales ubicadas en la subserosa y positivas para PDX1, se agrupan en estructuras acinares y expresan el marcador acinar amilasa y el factor de transcripción acinar PTF1A, confirmándose la presencia de tejido pancreático ectópico en el estómago (Fig. 68)

A estadio P1 y adulto los análisis histológicos e de inmunofluorescencia confirmaron la presencia de tejido ectópico con características pancreáticas (Fig. 68). Algunas de las células del linaje PDX1 expresan marcadores acinares como amilasa, PTF1A, y ductales como SOX9 (Fig. 69).

En estadio adulto, se observó células positivas para marcadores endocrinos pancreáticos, como las hormonas insulina y glucagón. La distribución de estas células forma estructuras similares a islotes pancreáticos de ratón, con las células positivas para insulina en el centro del islote y las células positivas para glucagón en la periferia. Además, las células productoras de insulina expresan el marcador de células β maduras MAFA y son positivas para el sensor de la glucosa GLUT2 (Fig. 70).

Por lo tanto, el páncreas ectópico del estómago de los ratones *G4KO* contiene células de los tres linajes pancreáticos: ductales, acinares y endocrinas.

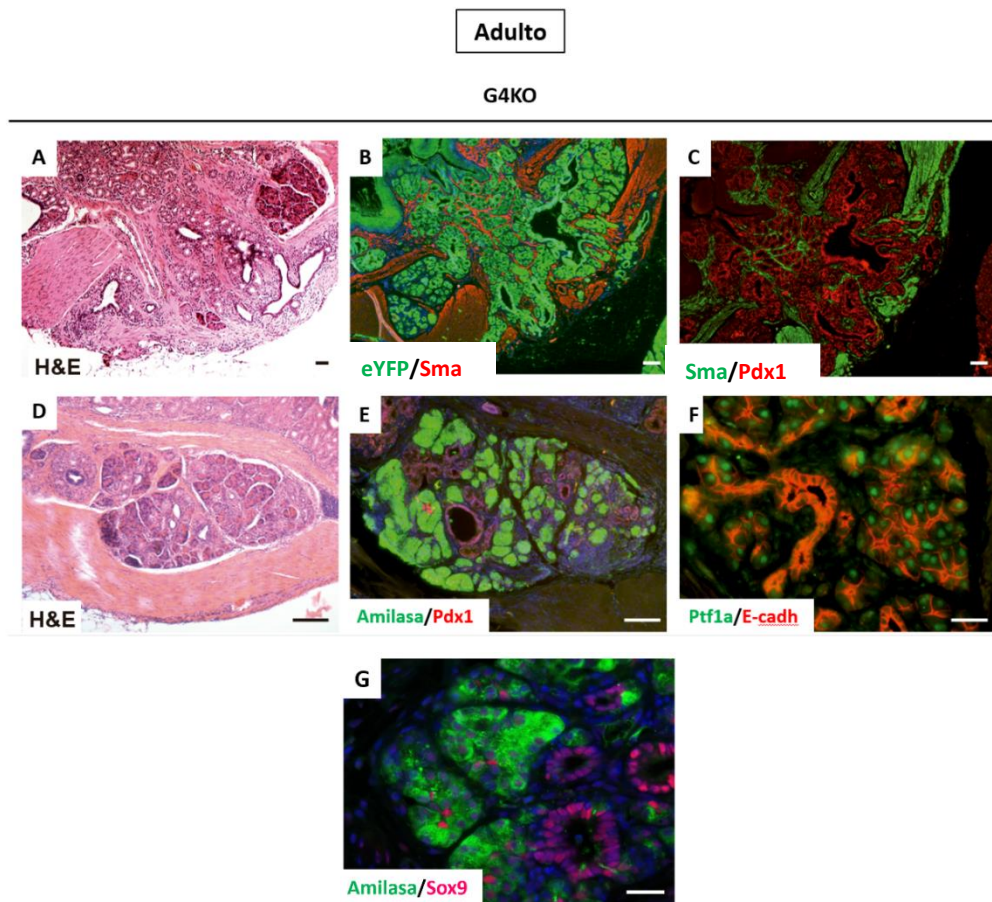


Figura 69. En la tinción con hemaaxilina y eosina (H&E) de las secciones histológicas a estadio adulto muestran que la masa de tejido pancreático ectópico aumenta (A-D). El páncreas ectópico presenta células positivas para amilasa (E), Ptf1a (F) y Sox9 (G). Barra de escala: (A-E): 100 μ m; (F, G): 25 μ m.

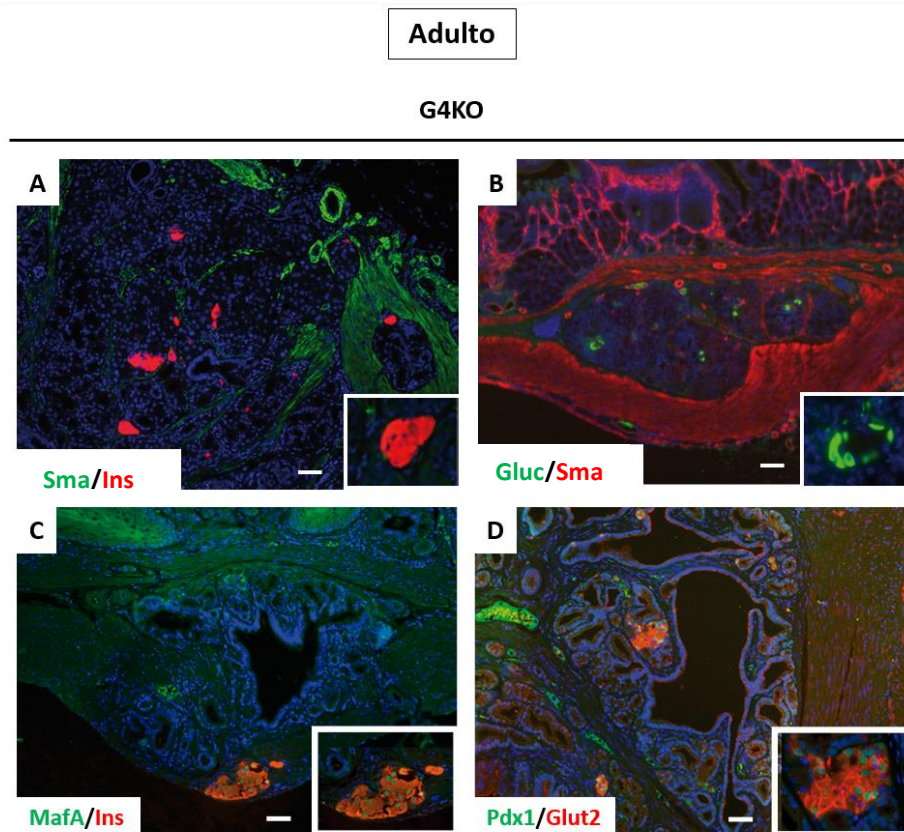


Figura 70. A estadio adulto, las inmunfluorescencias del páncreas ectópico muestran que las hay células forman agrupados expresando insulina en el centro (A) y glucagón alrededor (B). Los islotes también son positivos para marcadores de maduración de las células β , como MAFA (C), y para el transportados de la glucosa GLUT2 (D). Barra de escala: 100 μ m.

4.1 La formación del páncreas hetetotópico en los ratones *Gata4 knockout* es independiente de la ruta Notch y *Ngn3*

Como se menciona en la Introducción, la heterotopia pancreática es una anomalía congénita y se define como la presencia de tejido extrapancreático sin continuidad vascular o anatómica con el páncreas normal u ortotópico.

El mecanismo patogénico por el que se produce la heterotopia en humanos no se conoce. En modelos animales de ratón, la formación del páncreas ectópico se ha asociado a defectos en importantes rutas de señalización embrionarias durante la organogénesis pancreática. La inactivación de *Hes1* en ratones, transductor de la ruta Notch y represor de la *Ngn3* (marcador de progenitores pancreáticos), conduce a la

formación de páncreas ectópico en el estómago, duodeno y el conducto biliar (Sumazaki *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2006), debido a malformaciones del páncreas dorsal como consecuencia de la desinhibición de la *Ngn3*. El páncreas dorsal se extiende a lo largo de la curvatura mayor del estómago e ingresa en el epitelio glandular gástrico.

Para determinar si la heterotopia pancreática de los ratones *G4KO* presentaban alteraciones en la expresión de *Hes1* y *Ngn3* en el páncreas dorsal de los embriones a E13.5 se analizó la expresión de estos marcadores en el epitelio gástrico de los ratones *G4KO*.

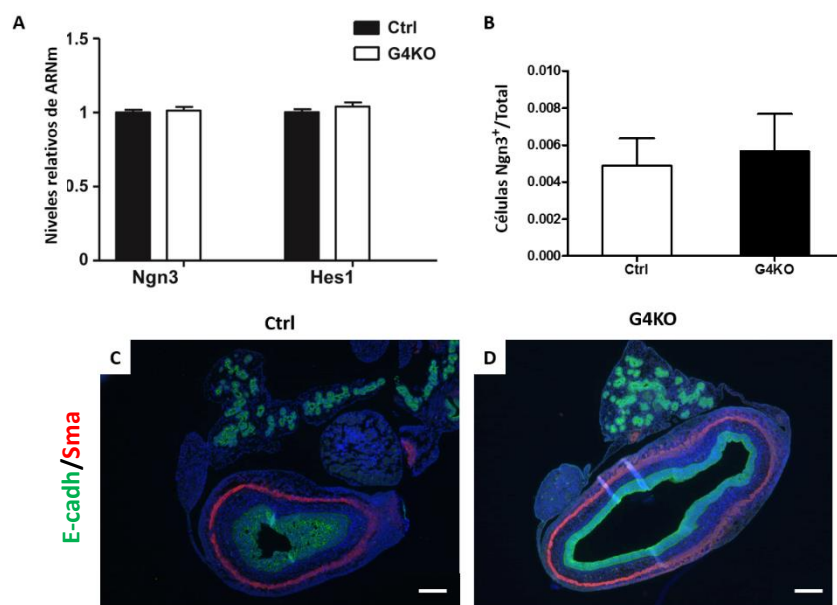


Figura 71. En el páncreas de los ratones *G4KO* *Hes1* y la *Ngn3* se expresan normalmente. (A) La expresión de *Ngn3* y *Hes1* del páncreas dorsal se analizó mediante qPCR, no habiendo diferencias entre los ratones control y *G4KO* a E13.5. n= 3 agrupados de 5 páncreas dorsales por genotipo (B) La cuantificación de las células positivas para *NGN3* respecto al número total de células marcadas con DAPI de los análisis de inmunofluorescencia de secciones histológicas del páncreas dorsal a E13.5 revelan que no existen diferencias entre los ratones control y los ratones *G4KO*. n=3 por genotipo (C y D) Los análisis de inmunofluorescencia para E-cadherina y α -actina de músculo liso de los ratones control y *G4KO* a E13.5 muestran que la morfología del epitelio pancreático es normal y que no existe contacto con el epitelio glandular gástrico. Barra de escala: 100 μ m.

Los análisis de inmunofluorescencia para e-cadherina y α -actina del músculo liso de los páncreas dorsales de los ratones *G4KO* muestran que la arquitectura y disposición del órgano en desarrollo es normal comparado con los ratones control. No se observó fusión alguna entre el epitelio pancreático dorsal y el del estómago en los ratones *G4KO*, como

se describió en los ratones mutantes *Hes1*. Más aún, la cuantificación de la expresión de ARNm mediante qPCR de *Hes1* y *Ngn3* en el páncreas dorsal de los ratones *G4KO* presentaron valores similares a los de los ratones control (Fig. 71). La cuantificación de células positivas para NGN3 en el páncreas dorsal de los ratones *G4KO* no mostraron diferencias significativas con respecto a las cuantificadas en el páncreas dorsal de los ratones control (Fig. 71B). Estos resultados indican que la formación de páncreas ectópico en los ratones *G4KO* no se debe a una disminución de la señalización de Notch ni a una sobreexpresión de Neurogenina3.

4.2 La inactivación de GATA4 en el *antrum* del estómago es esencial para la formación del páncreas heterotópico

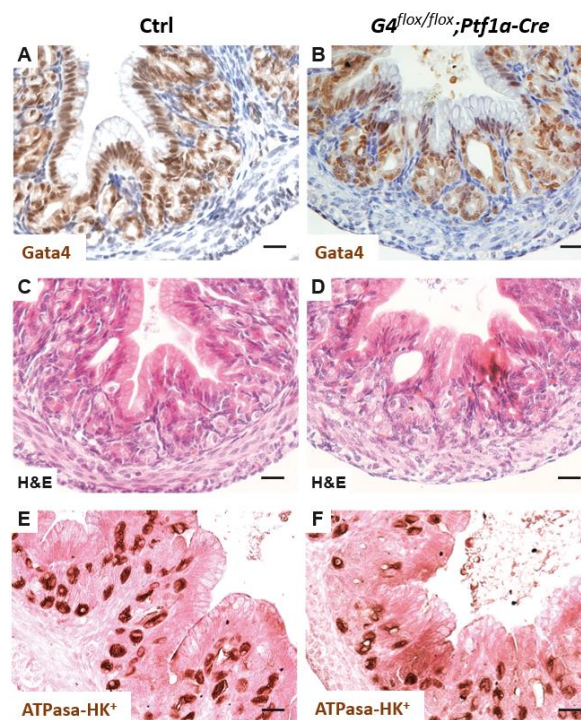


Figura 72. Los ratones *Gata4^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* no presentan defectos en el epitelio glandular gástrico. Los análisis de inmunohistoquímica muestran que el epitelio gástrico glandular de los ratones *Gata4^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* expresa GATA4 (B) a igual intensidad que en los ratones control (A) a estadio P1. Las secciones histológicas del epitelio glandular teñidas con hematoxolina y eosina (H&E) presentan una morfología similar en los ratones control (C) y en los ratones *Gata4^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* (D). Además, las inmunohistoquímicas para ATPase-HK⁺ muestran que el epitelio glandular de los ratones *knockout* está bien diferenciado. Barra de escala: 25 μ m.

Para determinar si la formación del páncreas ectópico requiere la ausencia de actividad GATA4 en el dominio del estómago, se cruzaron los ratones *Gata4^{flox/flox}* con la línea de ratón *Ptf1a-Cre* (Nakhai *et al.*, 2007). *Ptf1a* se expresa en los progenitores pancreáticos a partir del estadio E9.5, aunque después restringe su expresión al linaje acinar pancreático. Por lo tanto, no se expresa en el dominio del estómago. Como era de esperar, en el *antrum* de los estómagos de los ratones *Gata4^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* no hubo escisión de los sitios *LoxP* de *Gata4* y por tanto se observó la acumulación de GATA4 en dicho dominio mediante técnicas de inmunohistoquímica (Fig. 72). El análisis histológico mediante tinción con H&E mostró que las glándulas gástricas del epitelio glandular están bien formadas y la inmunodetección de ATPasa-HK⁺ reveló la presencia de células parietales bien diferenciadas. En los análisis histológicos realizados en estómagos procedentes de 10 ratones *Gata4^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* mediante tinción con H&E no se encontró tejido pancreático ectópico en ninguno de ellos (Fig. 72).

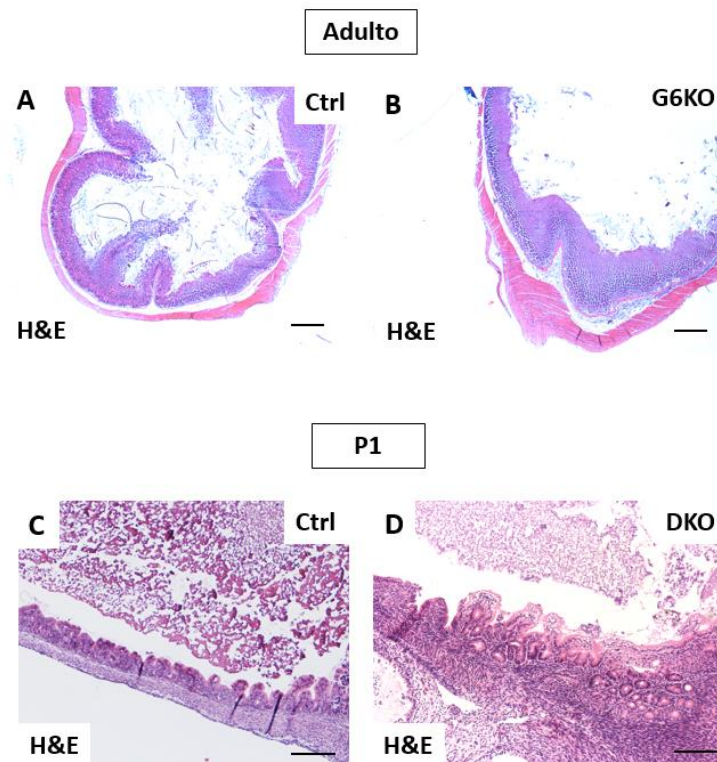


Figura 73. (A, B) Las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de los ratones adultos muestran que el epitelio del *antrum* de los ratones *G6KO* presenta una morfología del epitelio glandular normal y sin formación de páncreas ectópico. Sin embargo, (D) los ratones doble mutantes para *Gata4* y *Gata6* (*DKO*) presentan defectos en la morfología del epitelio glandular en comparación con el epitelio de los ratones control (Ctrl) a P1 (C), pero ausencia de páncreas ectópico en el estómago. Barra de escala: (A, B): 500 μm, (C, D): 100 μm.

Estos resultados indican que la ausencia de GATA4 en el dominio del estómago es necesaria para la formación de páncreas ectópico.

El factor de transcripción *Gata6* también se expresa en el epitelio glandular del estómago (Haveri *et al.*, 2008). Dado que ambos factores de transcripción, GATA4 y GATA6, tienen funciones celulares similares e incluso papeles redundantes en el desarrollo de distintos órganos, incluidos el páncreas (Carrasco *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012), se analizó si los ratones *Gata6*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* (G6KO) presentaban tejido pancreático ectópico en el estómago.

Sin embargo, al analizar los estómagos de los ratones G6KO tampoco se encontró tejido pancreático ectópico y el epitelio glandular del *antrum* presenta una morfología correcta. Por lo tanto, la formación del páncreas ectópico es específica de la ausencia de actividad GATA4 (Fig. 73A-B).

Curiosamente, el análisis de los ratones doble mutantes para *Gata4* y *Gata6* también presentaban defectos en la morfología del epitelio glandular, probablemente debido a la falta de GATA4, sin embargo, ninguno de los ratones mutantes doble para *Gata4* y *Gata6* presentaron páncreas ectópico en el estómago. Estos resultados confirman el requerimiento de ambos factores de transcripción para la formación de tejido pancreático, ya sea páncreas ortotópico o ectópico (Fig. 73C-D).

5. El epitelio gástrico glandular de los ratones *Gata4* knockout expresan marcadores pancreáticos

Los resultados observados en el análisis morfológico del *antrum* de los ratones *Gata4*^{flox/flox}; *Pdx1-Cre* sugieren que el páncreas ectópico se origina directamente a partir de células del epitelio glandular gástrico.

Para evaluar el papel del epitelio glandular gástrico como origen del páncreas ectópico, se analizó en detalle el epitelio glandular de los ratones utilizando diferentes marcadores pancreáticos. Se encontraron células dispersas positivas para insulina y glucagón en el dominio *Pdx1* en el epitelio del *antrum* del epitelio gástrico y en el epitelio del duodeno proximal de los ratones G4KO (Fig. 74). Un análisis en más detalle reveló

que regiones del epitelio glandular de los ratones *G4KO*, donde se ha deletado *Gata4*, reaccionan con la lectina *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) que se une específicamente a las células del compartimento ductal pancreático. Además, se

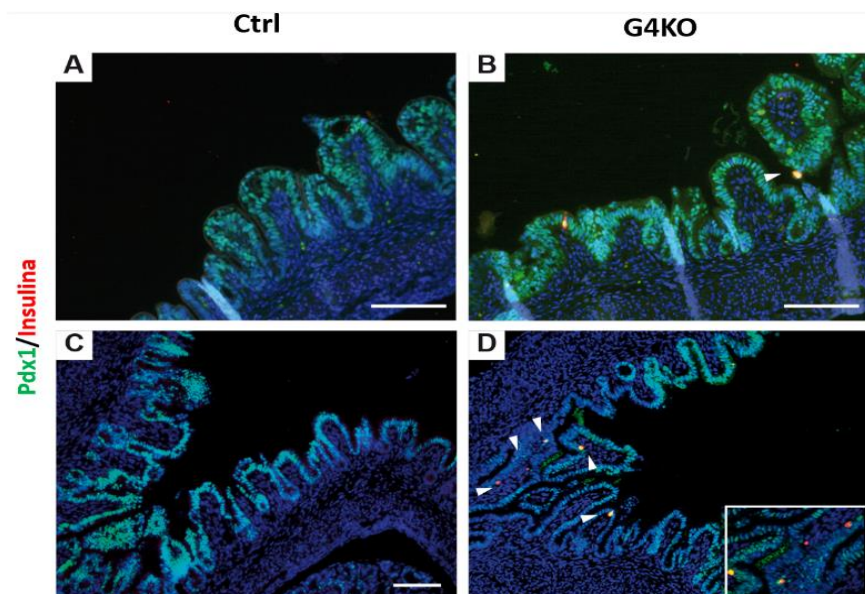


Figura 74. Células del epitelio glandular de los ratones *G4KO* expresan marcados endocrinos pancreáticos. Los análisis de inmunofluorescencia de la región del epitelio glandular en desarrollo (A, B) y del duodeno proximal (C, D) de los ratones *G4KO* muestran que hay células positivas para insulina (indicadas con puntas de flechas) en los ratones *G4KO* (B, D), a diferencia de en los ratones control (A, C). Barra de escala: 100 μ m.

observó que dichas regiones que reaccionaron con la lectina DBA presentaban una sobreexpresión del marcador ductal HNF1 β . Como se ha descrito anteriormente, en esta ocasión también se observa como las células positivas para HNF1 β localizadas en el epitelio glandular presentan una continuidad con las células invaginadas dentro de la capa subserosa interrumpiendo la capa muscular (Fig. 75).

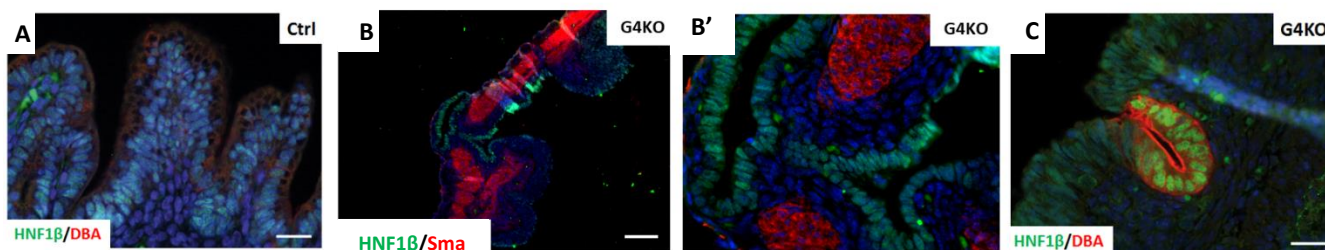


Figura 75. Áreas del epitelio glandular gástrico de los ratones *G4KO* presentan expresión del marcador ductal pancreático Hnf1 β (B, B') ausentes en el epitelio de los ratones control (A). Además, algunas de las regiones positivas para Hnf1 β reaccionan a la lectina DBA (C). La imagen B' es un aumento de la imagen B. Barra de escala: (A y D): 25 μ m; (C): 100 μ m.

Estos resultados sugieren que el tejido pancreático ectópico de los ratones *G4KO* pudiera deberse a un fenómeno de metaplasia en el que las células del epitelio glandular gástrico adquieran un fenotipo pancreático.

6. La presencia de páncreas ectópico en humanos se asocia a una disminución de la expresión de *GATA4*

Como se mencionó en la introducción, hasta la fecha no existen estudios genéticos que relacionen la heterotopia pancreática con mutaciones de genes en humanos. Para investigar la posible contribución de *GATA4* a la heterotopia en humanos, se evaluó la expresión de *GATA4* en biopsias de pacientes que presentaban páncreas ectópico en el estómago o en la parte proximal del duodeno. Se analizaron 24 muestras histológicas procedentes del biobanco del Hospital Virgen del Rocío (HUVR-IBIS, Sevilla). Los cortes histológicos fueron analizados mediante tinción con H&E y técnicas de inmunofluorescencia.

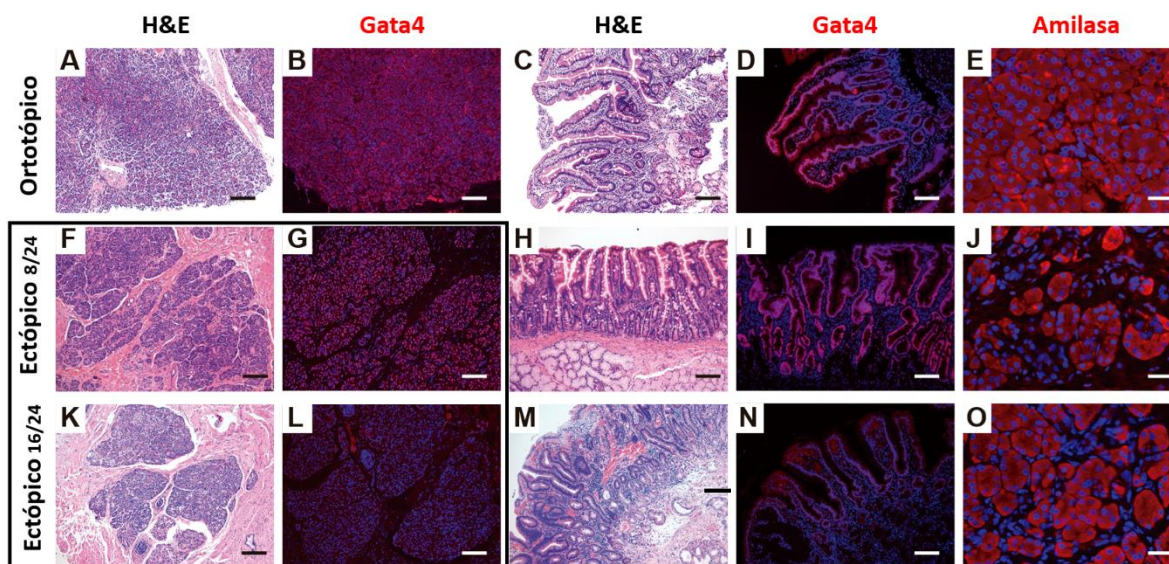


Figura 76. Expresión de *GATA4* en los páncreas ectópicos humanos. Los análisis histológicos y de inmunofluorescencia de biopsias pancreáticas (A, B y E) y gástricas (C y D) control y de pacientes con páncreas heterotópico (F-O) muestran que 8 de las 24 biopsias del páncreas heterotópico (G) presentan niveles similares de la proteína *GATA4* a los observado en los páncreas ortotópicos (B). sin embargo, 16 de las biopsias presentan una disminución drástica en la acumulación de *GATA4* (L). La expresión de *GATA4* en el epitelio glandular (D, I) o del duodeno proximal (N) se correlaciona con el observado en el tejido pancreático ectópico. Todos los pacientes presentan niveles similares de la proteína amilasa en el tejido pancreático ortotópico (E, J, O). Barra de escala: (A-D, F-I, K-N): 100 μ m; (E, J, O): 25 μ m.

La expresión de *GATA4* fue evaluada comparando la señal de la inmunodetección de *GATA4* del páncreas ectópico con el de muestras de páncreas ortotópico de pacientes sanos. Ocho de los veinticuatro pacientes analizados mostraron niveles de *GATA4* en el páncreas ectópico similares a los observados en el páncreas ortotópico. Sorprendentemente, dieciséis de las veinticuatro muestras presentaron una clara reducción en la acumulación de la proteína *GATA4*. De las 24 muestras de biopsias de pacientes con páncreas heterotópico, 18 de ellas contenían además tejido gástrico glandular, lo que permitió evaluar la expresión de *GATA4* en ambos tejidos de un mismo paciente. Los resultados de estos análisis mostraron una fuerte correlación en la señal de inmunodetección de *GATA4* en el epitelio glandular y en el tejido pancreático ectópico en todas las muestras.

Hay que hacer notar que todas las muestras de páncreas analizadas mostraban un fuerte marcaje para amilasa en las células acinares, lo que asegura tanto el adecuado análisis inmunohistoquímico como la integridad de los tejidos biopsiados (Fig. 76).

Estos resultados indican que los niveles de *GATA4* se correlacionan frecuentemente con la presencia de páncreas ectópico.

V. DISCUSIÓN

PARTE A. Papel del factor de transcripción GATA6 en la función de la célula β

La diabetes es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial. El tratamiento y seguimiento de los pacientes con diabetes supone un impacto negativo económico para la sanidad. La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas contra la diabetes se hace por tanto necesaria. En este contexto es indispensable conocer los mecanismos moleculares y celulares que controlan la función pancreática y los genes implicados en el control de la célula β (International Diabetes Federation, 2017). Los estudios genéticos en humanos junto con los estudios preclínicos en ratones han permitido identificar numerosos factores de transcripción conservados en ambas especies que juegan un papel importante tanto en el desarrollo del páncreas como en la función de la célula β adulta, entre ellos el factor GATA6 (D'Amato *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2012; Shaw-Smith *et al.*, 2014).

La identificación de pacientes heterocigotos para *GATA6* con diabetes en estadios adultos hacían sugerir el posible papel de GATA6 en la función de la célula β y en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Esto supondría una nueva función de GATA6 más allá de su claro papel en el desarrollo embrionario del páncreas (Allen *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2012; De Franco *et al.*, 2013).

El desarrollo de nuevas tecnologías como la edición del ADN mediante CRISPR/Cas9 y los protocolos de diferenciación de células pluripotentes han permitido confirmar el papel fundamental de este factor de transcripción en el desarrollo del páncreas y en la función de células β . Por una parte, estos estudios han permitido identificar la interacción funcional entre GATA4 y GATA6 previamente observada en modelos animales (Carrasco *et al.*, 2012). Estos resultados pueden ser contradictorios con los datos genéticos de humanos, donde la pérdida de función de un alelo de *GATA6* produce un gran impacto en la organogénesis del páncreas. Las diferencias en el tiempo que se requiere para cada etapa en el desarrollo del páncreas entre humanos y ratones podrían explicar las diferencias en los fenotipos entre ambas especies en ausencia de GATA6. Por ejemplo, mientras que la diferenciación endocrina en ratones ocurre en un periodo

relativamente corto, en humanos requiere de un tiempo más prolongado (Jennings *et al.*, 2015), siendo por tanto más susceptibles a la pérdida de un alelo GATA.

Los tres estudios realizados con células multipotentes modificadas para *GATA6* presentan algunas controversias. Sólo en uno de estos estudios las células β generadas tras la inducción de la diferenciación *in vitro* resultan en células β con defectos en síntesis y en secreción de insulina, mientras que en los otros estudios las células β no presentan dichos defectos. El uso de diferentes protocolos de diferenciación usados en cada estudio, inhibidores de la ruta Hedgehog, ácido retinoico, factores de crecimiento, etc., pudieran ser la causa de las diferencias en la funcionalidad de las células β generadas *in vitro* (Shi *et al.*, 2017b; Tiyaaboonchai *et al.*, 2017; Chia *et al.*, 2019).

A pesar de la gran herramienta que supone la manipulación de células multipotentes para modelar las mutaciones encontradas en humanos, existen ciertas limitaciones técnicas para estudiar la funcionalidad de las células β generadas en un contexto más fisiológico.

En esta tesis hemos usado modelos de ratón *knockout* condicional para estudiar el papel de *GATA6* en la célula β . Nuestros resultados ponen de manifiesto la contribución de este factor de transcripción al control de la homeostasis de la glucosa y a la función de la célula β . Los ratones deficientes en *Gata6* en el páncreas presentan una intolerancia a la glucosa a partir de los seis meses de edad, principalmente debido a defectos en la biosíntesis y secreción de la insulina, afectando notablemente al transcriptoma de los islotes.

La disminución en el contenido de insulina en islotes y en los niveles de insulina en plasma de ratones *G6KO* no parecen ser debidos a defectos en la formación y/o generación de las células β . Sin embargo, tanto la arquitectura de los islotes de ratones *G6KO* como la cuantificación de la masa β son similares a la de los ratones control. Alternativamente, defectos en la maduración de la célula β pudieran explicar el menor contenido en insulina. En este sentido, se observa una disminución del marcador de maduración *MafA*. *MAFA*, junto con otros factores de transcripción como *PDX1* y *NKX6.1*, son esenciales para la transcripción y la secreción de la insulina (Kataoka *et al.*,

2002; Matsuoka *et al.*, 2004; Iype *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2013). Curiosamente, estos otros factores de transcripción también están disminuidos en ausencia de GATA6. Previos estudios del laboratorio mostraron que *Pdx1* es un gen diana de los factores GATA4 y GATA6 durante el desarrollo embrionario, mediante la unión de éstos el área III de la región reguladora de *Pdx1* (Carrasco *et al.*, 2012). Los sitios GATA en el área III también son necesarios para la expresión de *Pdx1* en las células β adultas. Teniendo en cuenta que PDX1 regula la transcripción de *MafA*, podríamos suponer que la disminución de la expresión de *Pdx1* en los islotes de los ratones *G6KO* explicaría también la disminución en la expresión de *MafA*.

Además de *Pdx1*, la identificación de otros genes diana de GATA6 mediante cromatina inmunoprecipitada (ChIP Seq) con anticuerpos anti-GATA6 de islotes aislados sería fundamental para esclarecer los mecanismos moleculares por los que ejerce su control de la función de la célula β .

La disminución en la expresión de SNAP-25, una proteína t-SNARE que media la fusión de las vesículas de secreción con la membrana citoplasmática y en la exocitosis de los gránulos de insulina, en los islotes deficientes en *Gata6* pudiera contribuir a los defectos en la secreción de insulina de los ratones *G6KO* (Jeans *et al.*, 2007; Leung *et al.*, 2007). Las proteínas SNARE están presentes en el grupo de vesículas de secreción de fácil liberación, que se encuentran cerca de la membrana plasmática y que se liberan alrededor de 5 minutos tras el estímulo de la glucosa, mediante la cual se libera la mayoría de insulina que contienen las células β (Wang and Thurmond, 2009; Seino, Shibasaki and Minami, 2011). Esto podría explicar que en los ratones *G6KO* ya a los 5 minutos tras la carga intraperitoneal de glucosa disminuye la concentración de insulina en plasma. Las dificultades para la fusión de las vesículas con la membrana podrían explicar porque tanto los niveles de insulina como de proinsulina en plasma disminuyen en los ratones *G6KO*. A pesar de la disminución de proinsulina e insulina, la ratio proinsulina/insulina en el plasma de ratones *G6KO* no se ve afectada con respecto a la de los ratones control. Por tanto, la bajada en la expresión de PCSK1, una enzima encargada de los primeros pasos en la biosíntesis de la insulina, no parece suficiente para afectar al correcto procesamiento de la insulina en los ratones *G6KO*.

Los islotes de los ratones *G6KO* también mostraron niveles reducidos en la expresión de *Slc2a2* y *Abcc8*, que codifican para GLUT2 y SUR1 respectivamente. Estas dos proteínas son clave para la detección y entrada de la glucosa, y en la secreción de la insulina estimulada por glucosa, respectivamente (Guillam, Dupraz and Thorens, 2000; Seghers *et al.*, 2000). La intolerancia a la glucosa que desarrollan los ratones *G6KO*, podría explicarse en parte, debido a defectos en la entrada de la glucosa en la célula β . Anteriormente, en la tesis doctoral presentada por el Dr. Manuel Carrasco (2016), se describió que los ratones *G6KO* tratados con estreptozotocina (STZ) presentan cierta resistencia al daño causado por este compuesto y retrasa la aparición de la diabetes producida por la muerte de las células β comparados con los ratones control. La disminución en la expresión de *Slc2a2* explicaría la protección contra la diabetes en estos experimentos, ya que la molécula de STZ se incorpora a la célula β a través del transportador GLUT2. Además, la ausencia de GLUT2 en los islotes de ratón conduce a la pérdida de la primera fase de la secreción de insulina, pero se conserva la segunda fase de secreción. Incluso en ausencia de GLUT2, las células β captan la glucosa, aunque de forma limitante y se promueve la respuesta secretora de la insulina (Guillam, Dupraz and Thorens, 2000). Sin embargo, en el caso de los ratones *G6KO* la expresión de *Slc2a2* y *Abcc8* no disminuye lo suficiente como para afectar a la secreción de la insulina inducida por glucosa. Aunque en los ratones *G6KO* la secreción basal de insulina disminuyó y la secreción tras la estimulación por glucosa es menor, la ratio entre insulina basal e insulina estimulada por glucosa es similar. De acuerdo con estos resultados, la respuesta intracelular de calcio a la glucosa no se vio afectada en los islotes de los ratones *G6KO*, es decir, las células β deficientes en *Gata6* son capaces de responder a altas concentraciones de glucosa. Un fenómeno similar, se ha descrito en ratones mutantes para otros genes que codifican factores de transcripción claves de la célula β como *Nkx6.1*, donde además también observaron una disminución en la expresión de *Slc2a2* (Taylor, Fen-Fen and Sander, 2013).

A pesar de los defectos en la transcripción, la biosíntesis y la secreción de la insulina, los ratones *G6KO* no desarrollan hiperglucemia. Además, no se ha observado un efecto compensatorio como por ejemplo un aumento en el área de masa β o el desarrollo de sensibilidad a la insulina que pudiera explicar la ausencia de un fenotipo hiperglucémico.

Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos compensatorios, como la regulación neural o el efecto de la hormona incretina en la secreción de la insulina. De hecho, la inactivación de otros factores de transcripción en las células β como RFX6 y NeuroD también provoca disfunción de las células β e intolerancia a la glucosa sin desarrollo de hiperglucemia (Gu *et al.*, 2010; Piccand *et al.*, 2014).

La ausencia de GATA6 produce intolerancia a la glucosa sin desarrollo de diabetes, incluso en ratones de edades más avanzadas. Sin embargo, esta intolerancia a la glucosa puede representar un estado prediabético que preceda al desarrollo de la diabetes. Debemos tener en cuenta que estos ratones se mantuvieron siempre con una dieta estrictamente equilibrada que no mimetiza la dieta normal de la población, ni estuvieron expuestos a un estrés metabólico. Por lo tanto, en un futuro sería interesante estudiar la contribución de GATA6 al desarrollo de la diabetes en una situación en la cual se produzca una carga metabólica, como la obesidad o el embarazo. Durante el embarazo la masa β aumenta para hacer frente a la demanda metabólica de insulina (Baeyens *et al.*, 2016; Nielsen, 2016). Uno de los primeros factores a tener en cuenta es si la expresión del gen *Gata6* aumenta en las células β durante la gestación, ya que GATA6 podría ejercer un papel importante en el control de la expansión de la masa β durante el embarazo. De hecho, se ha demostrado que GATA6 juega un papel regulador de la proliferación celular en varios tipos celulares (Beuling *et al.*, 2011, 2012).

Otra situación de carga metabólica es la exposición a ácidos grasos saturados que inducen la activación del estrés oxidativo y del RE en la célula β , contribuyendo al desarrollo de la diabetes en individuos predispuestos genéticamente (Karaskov *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008). El estudio de secuenciación de ARN de islotes aislados humanos cultivados con ácidos palmítico (el ácido graso saturado más común en nuestra dieta), reveló alteración en la expresión de genes relacionados con el estrés del RE. Además, en estos estudios observaron una disminución en la expresión del gen *GATA6* (Cnop *et al.*, 2014). Por lo tanto, sería posible que mutaciones en *GATA6* pudieran predisponer al desarrollo de diabetes en condiciones de carga metabólica, como una dieta rica en grasas saturadas. El fenotipo de los ratones *G6KO* se podría ver exacerbado al someterse a esta dieta alta en grasas saturadas y desarrollar diabetes. Este ensayo

debería realizarse durante un máximo de 4 meses desde el destete, ya que a partir de esta edad es cuando los ratones *G6KO* comienzan a presentar defectos en la homeostasis de la glucosa. Sería interesante analizar la expresión de *Gata6* y estudiar la contribución de GATA6 al mantenimiento de la identidad de las células β en este modelo de diabetes tipo 2 inducido por una dieta alta en grasas; así como la contribución de GATA6 en la homeostasis de la glucosa durante la gestación.

La disfunción de la célula β de los ratones *G6KO* también podría ser explicada por un mecanismo de dediferenciación, mecanismo recientemente propuesto como una de las causas que subyace a la disminución de células β en la DMT2 (Jonas *et al.*, 1999; Talchai *et al.*, 2012; Marselli *et al.*, 2014; Cinti *et al.*, 2016; Bensellam, Jonas and Laybutt, 2018). Bajo ciertas condiciones, las células β maduras pueden perder su fenotipo diferenciado e identidad celular, regresando a un estado precursor. La dediferenciación de las células β implica: i) la disminución en la expresión de factores de transcripción característicos de las células β , como genes del metabolismo de la glucosa y de la vía secretora; ii) el aumento en la expresión de genes que normalmente no se expresan en las células β ; y iii) la regulación positiva de genes de células progenitoras (Bensellam, Laybutt and Jonas, 2012; Schuit *et al.*, 2012; Rutter *et al.*, 2015; Lemaire, Thorrez and Schuit, 2016; Lemaire *et al.*, 2017). Estas alteraciones conducen a la reconfiguración fenotípica de las células β , y en último término, a defectos en la secreción de la insulina. Los mecanismos moleculares identificados implicados en la dediferenciación de las células β incluyen el estrés oxidativo, el estrés del RE, la inflamación y la hipoxia (Jonas *et al.*, 2001; Ross Laybutt *et al.*, 2002; Pascal *et al.*, 2008; Robson *et al.*, 2011). Estudios más recientes también han mostrado que la pérdida del factor de transcripción FOXO1 está implicada en la dediferenciación de las células β y en el aumento de la expresión de marcadores de pluripotencia (Talchai *et al.*, 2012). Entre los genes que disminuyen en las células β que sufren dediferenciación se encuentran *Pdx1*, *Nkx6.1*, *MafA*, *Slc2a2* y *Abcc8*, entre otros (Talchai *et al.*, 2012; Accili *et al.*, 2016). Curiosamente, los niveles de expresión de esos mismos genes disminuyen en los islotes de los ratones *G6KO*. Además, en el análisis del *microarray* de estos mismos islotes aparece el gen *FoxO1* disminuido. Se ha propuesto que la dediferenciación es un mecanismo adaptativo para escapar de la muerte celular en condiciones de estrés. De hecho, este mecanismo está

conservado y se ha observado en otros tipos celulares, como las células cancerosas (Del Vecchio *et al.*, 2014; Roesch *et al.*, 2016). Una futura vía de investigación podría enfocarse en el estudio más profundo de estas células β de los ratones *G6KO* a diferentes edades para corroborar si presentan características de células desdiferenciadas, como la detección de un aumento en la expresión de genes progenitores o de marcadores de otros tipos celulares del islote, como glucagón.

Otra posible explicación al patrón de expresión diferencial en las células β de los ratones *G6KO* es la heterogeneidad de las células β con subpoblaciones de células dentro del islote (Pipeleers *et al.*, 2017). Se ha descrito que hay heterogeneidad intercelular en el contenido de ADN, con células β diploides, tetraploides y octaploides en el páncreas humano (Ehrie and Swartz, 1974). También existe heterogeneidad en la capacidad de respuesta a la glucosa, ya que no todas las células β son igual de sensibles al efecto de la estimulación de la glucosa en sus actividades metabólicas, biosintéticas y secretoras. Y, por último, heterogeneidad en marcadores de adhesión celular y citoplasmáticos (Bernard-Kargar *et al.*, 2001; Bosco, Rouiller and Halban, 2007; Karaca *et al.*, 2009). De hecho, no todas las células β en el páncreas adulto se forman simultáneamente, la mayoría tienen un origen postnatal. Por lo tanto, el momento de su maduración funcional y de senescencia probablemente también variará. De hecho, los análisis de transgénesis de las regiones reguladoras del gen *Pdx1* fusionado al gen *LacZ*, muestran que la disminución de la β -galactosidasa del transgén *Pdx1-mut-LacZ* no es homogénea en todas las células β creando un patrón de expresión en mosaico. Por tanto, es posible que estas células presenten diferentes niveles de expresión de *Pdx1*, y por consiguiente diferentes niveles en la detección de la β -galactosidasa. De acuerdo con esto, en los islotes *G6KO* se observa también cierto mosaicismo en la acumulación de otros marcadores de las células β como MAFA, NKX6.1 y NKX2.2.

El análisis mediante microscopía electrónica de los islotes deficientes en *Gata6* muestran anomalías morfológicas en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático que indican un posible estrés de estos orgánulos. El análisis de *microarray* confirma la desregulación de genes implicados en la función mitocondrial, como componentes de la cadena respiratoria y transportadores mitocondriales. Otras rutas relacionadas con la

fosforilación oxidativa y la ruta mTOR se ven también afectadas en ausencia de GATA6. Además, se observa una alta acumulación de iNOS en los islotes de los ratones *G6KO*, la cual se asocia con la disfunción mitocondrial y el estrés del RE (J. W. Lee *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2012).

Existen evidencias de que el estrés mitocondrial y del RE están interconectados y afectan a la funcionalidad de las células β (Malhotra and Kaufman, 2011; O'Sullivan-Murphy and Urano, 2012; Supale *et al.*, 2012; Tersey *et al.*, 2012; Engin *et al.*, 2014) y a la pérdida de masa β (Acharya and Ghaskadbi, 2010). El análisis de *Ingenuity Pathway* también desveló que la ruta de señalización mTOR estaba afectada, la cual también desempeña un papel importante en la interacción con la función mitocondrial y del RE (Kim-Muller *et al.*, 2016; Chau *et al.*, 2017).

La respuesta adaptativa del estrés del RE tiene como objetivo aumentar su capacidad funcional y disminuir el número de proteínas que llegan recién sintetizadas. Esto lo logra aumentando el número de enzimas chaperonas, expandiendo el RE y disminuyendo la tasa de traducción a través de *eIF2* para aliviar la carga del RE (Ron and Walter, 2007). En los islotes de los ratones *G6KO*, además de los cambios morfológicos observados del RE, los análisis de expresión confirman la alteración de la señalización de *eIF2*. Por lo tanto, esta respuesta fisiológica, a la vez que protege a la célula β secretora del estrés del RE, tiene efectos fisiológicos adversos como la reducción en la producción de insulina.

Por otro lado, se ha descrito que tanto la vía mTORC1 como la vía mTORC2 están involucradas en la función de la célula β . mTORC1 es un regulador positivo en la secreción de insulina de la célula β y lo hace a través de la activación de la proteína quinasa S6K1 (Pende *et al.*, 2000). La pérdida de función de mTORC2 en las células β causa hiperglicemia e intolerancia a la glucosa debido a una reducción en la masa de células β , en la proliferación y en la producción de insulina y su secreción (Wang, Yang and Zhang, 2016). La interacción entre el estrés del RE y la ruta mTOR es complicada, ya que la activación de la UPR puede ocurrir aguas arriba o aguas abajo de mTOR (Appenzeller-Herzog and Hall, 2012). El estrés del RE inhibe la vía Akt/mTOR1 y existen evidencias de que, en varias patologías como en la DMT2, la señalización de mTOR se

desregula. La ruta mTOR juega un papel complejo en la biosíntesis y secreción de la insulina, en parte a través de la resolución del estrés oxidativo o del estrés del RE (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006; Qin *et al.*, 2010; Nakajima *et al.*, 2011).

El estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplasmático están estrechamente interconectados y ocurren simultánea o sucesivamente. El estrés oxidativo induce el mal plegamiento de las proteínas en el RE al alterar el estado redox. Al mismo tiempo, el mal plegamiento de las proteínas conduce a la producción de ROS. Este doble efecto deletéreo provoca la disfunción de la célula β , y tienen efectos perjudiciales en la biosíntesis y secreción de la insulina en la célula β , así como en la respuesta inflamatoria, en particular en la DMT2 (Donath *et al.*, 2013; Novials, Montane and Cadavez-Trigo, 2014; Kaneto and Matsuoka, 2015; Hasnain, Prins and McGuckin, 2016).

El papel directo de GATA6 sobre la protección frente al estrés del RE y mitocondrial de la célula β , así como sus dianas moleculares no se conocen en detalle. Por lo tanto, es necesario un estudio más profundo de los islotes de los ratones *G6KO* para estudiar la contribución de GATA6 en el mantenimiento de la función mitocondrial y del RE de la célula β . En un futuro sería interesante analizar las rutas de señalización y factores de transcripción relacionados con la función mitocondrial y del RE de las células β deficientes para *Gata6* a diferentes edades. Respecto a la función mitocondrial, sería interesante determinar la relación ATP/ADP, el estrés oxidativo y la respiración mitocondrial de estas células. También estudiar la vía de señalización EIF2a en los islotes de los ratones *G6KO* mediante el análisis de los niveles de fosforilación de eIF2a. Y, por último, el estudio de la vía de señalización mTOR en los ratones *G6KO*, mediante el análisis de los niveles y localización nuclear de FOXO1, el estado de activación de transductores de la vía mTORC2 y los niveles de fosforilación de la proteína ribosomal S6 quinasa en los islotes.

Una de las estrategias para retrasar la progresión de la diabetes es la reducción de los efectos nocivos del estrés oxidativo sobre la función y la viabilidad de las células β , mejorando la capacidad antioxidante o disminuyendo la producción de ROS/RNS. Es importante destacar que es necesaria cierta cantidad de ROS/RNS para la función fisiológica de las células β (Bindokas *et al.*, 2003; Pi *et al.*, 2007; Leloup *et al.*, 2009). Por

lo tanto, el objetivo terapéutico debe centrarse en modular de forma equilibrada las rutas antioxidantes evitando la supresión completa de especies reactivas. Varios estudios en modelos animales con DMT2 han demostrado los efectos beneficiosos del tratamiento antioxidante en el curso de la enfermedad (Kaneto *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999). Sin embargo, en humanos los efectos beneficiosos de los tratamientos con antioxidantes no son consistentes y se requieren más estudios (Suksomboon, Poolsup and Sinprasert, 2011). Incluso en el trasplante de islotes en pacientes con DMT1 el estrés oxidativo sigue siendo una preocupación que dificulta el éxito del trasplante y la función de los islotes (Bottino *et al.*, 2004). Por ello, se están desarrollando tratamientos antioxidantes para reducir el estrés oxidativo de los islotes aislados antes del trasplante (Padmasekar *et al.*, 2013). Según los resultados presentados en esta tesis, el mantenimiento de la expresión de *GATA6* en islotes para el trasplante pudiera ser crucial para reducir el estrés de las células β .

Los resultados observados en los ratones *G6KO* parecen estar en contradicción con otros dos trabajos donde se inactiva *Gata6* en las células β de ratón usando diferentes líneas Cre. En uno de los estudios, se usó la línea *Ptf1a-Cre*, que expresa la recombinasa Cre en los progenitores pancreáticos, de forma similar a la línea *Pdx1-Cre* usada en este estudio. En este trabajo, los ratones *Gata6^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* no presentaban intolerancia a la glucosa ni pasadas las 30 semanas de edad (Martinelli *et al.*, 2013). Quizás diferencias en la eficiencia de escisión de esta línea Cre o en el patrón de expresión temporal ligeramente tardío de *Ptf1a* con respecto a *Pdx1* pudieran explicar las diferencias en el fenotipo de intolerancia a la glucosa (Burlison *et al.*, 2008; Puri *et al.*, 2013).

En otro estudio, donde inactivaron *Gata6* específicamente en las células β adultas utilizando la línea de ratón *Ins2-Cre^{ERT}* tampoco observaron defectos en la homeostasis de la glucosa (Sartori *et al.*, 2014). Sin embargo, los autores de este estudio determinaron que la escisión de *Gata6* fue ineficiente (tan solo del 40% frente al 80% en nuestro modelo). Dado que los ratones heterocigotos para *Gata6* no presentan intolerancia a la glucosa, no es de extrañar que los ratones *Gata6^{flox/flox}; Ins2-Cre^{ERT}* que

contienen un 60% de proteína GATA6 no presenten defectos en el metabolismo de la glucosa.

La intolerancia a la glucosa de los ratones *G6KO* puede ser consecuencia de fallos ocurridos durante el desarrollo embrionario, dada la inactivación temprana con la línea *Pdx1-Cre*. La falta de una línea Cre eficiente que permita inactivar *Gata6* en las células β adultas no permite esclarecer esta hipótesis. Los experimentos *in vitro* de inactivación de *Gata6* en islotes realizados en esta tesis no muestran diferencias en la expresión génica en ausencia de GATA6 con respecto a células β control. Aunque estos experimentos están lejos de poder ser concluyentes respecto al origen de los defectos desarrollados en los ratones *G6KO*, sugieren que la inactivación de *Gata6* no tiene un efecto inmediato sobre la función de la célula β . De hecho, a pesar de que la inactivación de *Gata6* en los ratones *G6KO* ocurre temprano durante el desarrollo, no desarrollan la intolerancia a la glucosa hasta los 6 meses de edad. La escasa calidad de los islotes humanos, pese a la correcta inactivación de GATA6 (un 60% de silenciamiento) no nos han permitido establecer el papel de este factor de transcripción en la célula β adulta. El acceso a islotes humanos de calidad es complejo, especialmente en España donde la fuente de islotes viene de otros países y tanto la extracción como el transporte merman la calidad e integridad de los islotes.

El defecto progresivo en la homeostasis de la glucosa es frecuente en modelos de ratones con disfunción en las células β y podría ser debido a un aumento del estrés metabólico asociado con la edad, al estrés oxidativo y del RE, y al aumento del peso corporal del animal. Los ratones *G6KO* a los 6 meses de edad desarrollan defectos exocrinos, con acumulación de tejido adiposo que podría inducir estrés y afectar a la función de los islotes. Aunque no podemos descartar el impacto del deterioro del tejido exocrino en el endocrino, esto no parece probable dado que: i) la alteración en la expresión génica de las células β se observa a los 2 meses de edad, antes de que se observen defectos exocrinos evidentes; ii) la polaridad de las células acinares no se encuentra alterada y los niveles plasmáticos de amilasa en los ratones *G6KO* a 2 y 6 meses de edad no aumentan, lo cual indica que no existe daños severos en las células acinares; y iii) los ratones *Gata6^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* de 30 semanas de edad, a pesar de

presentar anomalías exocrinas agudas (incluyendo lipomatosis, niveles de amilasa elevados en plasma y defectos en la polaridad acinar) no desarrollan defectos en la homeostasis de la glucosa.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que *GATA6* es un regulador del metabolismo de la glucosa controlando la expresión de genes clave de la maquinaria de síntesis y secreción de la insulina, así como de los factores de transcripción característicos de las células β . Estos resultados pudieran explicar el fenotipo de diabetes observado en humanos adultos con mutaciones en *GATA6*. Es necesario un estudio más extenso para determinar si *GATA6* es un nuevo gen MODY. En ese caso sería un MODY de origen multifactorial como ocurre en los MODY5 (*HNF1 β*) y MODY6 (*NeuroD*), en la que los factores ambientales también determinan el desarrollo de la diabetes, como ocurre en la DMT2 (Horikawa, 2018).

PARTE B. Contribución de *GATA4* a la diferenciación e identidad de las células del epitelio glandular del estómago

La formación y localización de los órganos y tejidos está determinado por programas de desarrollo embrionario estrictamente coordinados que implican la interacción entre señales extracelulares y una red de factores de transcripción intracelulares. Sin embargo, en ocasiones estos mecanismos no funcionan correctamente y los tejidos se forman en ubicaciones ectópicas. En humanos, la presencia de tejido pancreático heterotópico no se ha asociado aún a mutaciones en ningún gen.

Previos estudios usando ratones quimeras para *GATA4* mostraron que las células nulas para *GATA4* fallaban al diferenciarse correctamente (Jacobsen *et al.*, 2002). Sin embargo, en estos estudios no se esclarece si los defectos observados en la diferenciación celular son debidos a un papel autónomo de *GATA4* en el epitelio

glandular del estómago, ya que señales aguas abajo de *Gata4* en otros tejidos pudieran también contribuir a la diferenciación del epitelio glandular.

En esta tesis hemos usado un modelo de ratón *knockout* condicional para estudiar el papel de GATA4 en la especificación del epitelio gástrico glandular. Nuestros resultados ponen de manifiesto la contribución de este factor de transcripción en el mantenimiento del límite entre el estómago anterior o *forestomach* y el estómago posterior o *hindstomach*, y en la diferenciación de las células del epitelio glandular. La inactivación de *Gata4* en el dominio de expresión *Pdx1*, que incluye la región del *antrum* del estómago en desarrollo, así como la región proximal del duodeno y el páncreas embrionario, inhibe la correcta formación del epitelio glandular y conduce a la expresión de marcadores pancreáticos en el estómago glandular. Más aun, la deficiencia de *Gata4* provoca la formación de páncreas ectópico en la capa subserosa del estómago.

El trazado de linaje de la línea *Pdx1-Cre* usando la línea *Rosa26R-eYFP* muestra, como era de esperar, el *antrum* del estómago formado por células positivas para YFP. Sin embargo, es sorprendente que también se observen, aunque de forma muy mosaica, células YFP positivas en el *corpus* del estómago. Esto explica porque además de observar defectos en expresión de marcadores del *antrum* como la MUC5AC y la ghrelina, también se observen defectos en la expresión de marcadores de células parietales como la ATPasa-HK⁺, propias del *corpus*.

Como se explica en detalle en la Introducción, varios factores han sido implicados como responsables de la correcta regionalización y la delimitación del epitelio gástrico, entre ellos los ligandos de la ruta Hedgehog. La interrupción de la expresión *Shh/Ihh* en el estómago conduce a cambios en el límite escamocolumnar del epitelio. La pérdida de *Shh* o *HoxA5* en el dominio del *forestomach* induce la expansión del dominio de *Ihh* y posterioriza este epitelio expandiendo el epitelio glandular (Ramalho-Santos, Melton and McMahon, 2000; Aubin *et al.*, 2002). Por el contrario, la pérdida de la expresión de *Ihh* en el *hindstomach* provoca la inducción de *Shh*, con una anteriorización del epitelio que falla al formar las glándulas gástricas (Haumaitre *et al.*, 2005; Spencer-Dene *et al.*, 2006). Curiosamente, en los ratones *G4KO* observamos una transformación del

hindstomach a un epitelio estratificado escamoso en lugar de columnar. En particular, se observó una mayor expresión de marcadores característicos del epitelio del *forestomach* en la región del *antrum* en el estómago de los ratones *G4KO*, como SOX2 y la citoqueratina14, lo que sugiere que la pérdida de GATA4 podría conducir a una anteriorización del estómago posterior. En concordancia con estos resultados, la inactivación de *Gata4* en células de cáncer gástrico conduce a una mayor expresión de los marcadores del *forestomach*, incluido SOX2. Estos datos sugieren que GATA4 mantiene la identidad de las células del epitelio glandular gástrico mediante la represión de los marcadores de la región anterior del estómago. El mantenimiento de los límites entre otras regiones del tracto digestivo como el yeyuno y el íleon en el intestino delgado son también atribuibles a la función de GATA4 (Bosse *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2017). Aunque nuestros datos no nos permiten definir los mecanismos moleculares a través de los cuales GATA4 mantiene el límite entre el *hindstomach* y el *forestomach*, podemos hipotetizar que pudiera ser debida en parte a la activación de *Sox2* en el *hindstomach* en los ratones *G4KO*. *Sox2* juega un papel clave en la diferenciación del epitelio gástrico (Que *et al.*, 2009) y la expresión incorrecta o la ausencia de *Sox2* en la región posterior del intestino primitivo induce un fenotipo gástrico en el intestino (Raghoebir *et al.*, 2012).

El páncreas ectópico que se observa en los ratones *G4KO* presentan células acinares, ductales y endocrinas. Sorprendentemente, las células endocrinas se agrupan de forma similar a los islotes de Langerhans murinos, con células de insulina en el centro del islote y de glucagón alrededor. Aunque no hemos realizado ensayos de funcionalidad de las células β del páncreas ectópico, éstas expresan marcadores de maduración como MAFA y el sensor de glucosa GLUT2, por lo que pudieran responder a glucosa.

Como se mencionó en la Introducción, los mecanismos moleculares y patogénicos involucrados en la formación del páncreas heterotópico no se conocen bien. En ratones, mutaciones en *Hes1* causan disgenesia extrema del páncreas dorsal como consecuencia de la desinhibición de la expresión de la *Ngn3*. El epitelio pancreático llega a fusionarse con el epitelio del estómago (Jørgensen *et al.*, 2018). En nuestro modelo de estudio, sin embargo, no observamos cambios en la expresión de *Hes1* ni de *Ngn3* (gen diana de

Hes1). Más aún, los límites entre el epitelio pancreático y el del estómago están bien separados y definidos. Por tanto, la formación de páncreas ectópico en los ratones *G4KO* parece ser independiente de la señalización de Notch.

A falta de un trazado de linaje que nos permita identificar el origen de las células del páncreas ectópico en los ratones *G4KO*, varias evidencias circunstanciales favorecen la teoría de un fenómeno de metaplasia del epitelio glandular a pancreático. Entre ellas, los análisis histológicos y de inmunofluorescencia del epitelio gástrico invaginándose en la capa subserosa y expresando marcadores pancreáticos ductales como HNF1 β y lectina DBA o la presencia de células productoras de insulina en el epitelio del *antrum* y del duodeno. Estos resultados, junto con la ausencia de páncreas ectópico en los ratones *Gata4^{flox/flox}; Ptf1a-Cre* donde la inactivación de *Gata4* ocurre únicamente en los progenitores pancreáticos indican que la ausencia de GATA4 en el epitelio gástrico promueve la metaplasia para dar lugar a esta patología. La inactivación de *Gata4* específicamente en el epitelio glandular sería de gran utilidad para evaluar el papel de este factor en la metaplasia a tejido pancreático.

Aunque son necesarios más estudios para determinar el mecanismo exacto que precede a la formación de páncreas ectópico en el estómago, estos resultados indican que GATA4 juega un papel importante en el establecimiento de los linajes celulares durante el desarrollo del intestino anterior embrionario. La inactivación simultánea de *Gata4* y *Gata6* produce agenesia pancreática (Carrasco *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012), sin embargo los progenitores pancreáticos ventrales y dorsales deficientes para ambos factores de transcripción adquieren un linaje intestinal o estomacal, respectivamente (Xuan and Sussel, 2016).

La redundancia funcional entre GATA4 y GATA6 en la formación embrionaria del páncreas es también patente en el desarrollo del páncreas ectópico. Los ratones doble mutantes para *Gata4* y *Gata6* no presentan páncreas ectópico en el estómago, a pesar de presentar defectos en el desarrollo del epitelio glandular del estómago. Estos defectos en la morfología de las glándulas del estómago son debidos a la ausencia de GATA4, ya que la inactivación única de *Gata6* no produce ningún efecto.

En humanos, la heterotopia pancreática se observa con mayor frecuencia en el estómago y en el intestino, como se ha comentado detalladamente en la Introducción. La disminución de la señal de inmunodetección de GATA4 en un 66% de las muestras analizadas sugiere que GATA4 también podría estar asociado a la heterotopia pancreática en humanos. El hecho de que la disminución de señal para GATA4 en el páncreas ectópico se correlacione con una disminución también en el epitelio glandular del estómago, refuerza la hipótesis de un mecanismo de metaplasia para la heterotopia pancreática. Sin embargo, los datos obtenidos en humanos no nos permiten determinar si la pérdida de GATA4 es un requisito o es una consecuencia de la formación del páncreas heterotópico en estos pacientes.

Sería interesante analizar el epitelio gástrico de pacientes con mutaciones en *GATA4* y corroborar si existe una correlación directa entre las mutaciones en *GATA4* y la formación de páncreas ectópico en humanos. Por último, el entender los mecanismos moleculares que subyacen el cambio de fenotipo glandular a pancreático permitiría abrir una nueva fuente de generación de células β para el tratamiento de la diabetes.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones Parte A

1. El factor de transcripción GATA6 es necesario para mantener la tolerancia a la glucosa en ratones.
2. El factor de transcripción GATA6 es necesario para la biosíntesis y la secreción de insulina en ratones.
3. GATA6 es un regulador de la expresión genes importantes en la biosíntesis y secreción de insulina y de los principales reguladores transcripcionales claves para la función de las células β adultas.
4. GATA6 es un regulador directo de la expresión de *Pdx1* en las células β adultas a través de su unión a dos sitios GATA altamente conservados localizados en el área III de la secuencia *cis*-reguladora del gen *Pdx1*.
5. La ausencia de GATA6 induce defectos morfológicos en las mitocondrias, con aspecto hinchado y con crestas poco densas y en el retículo endoplasmático, con las cisternas desorganizadas.
6. El análisis de las rutas metabólicas afectadas en los islotes pancreáticos deficientes en *Gata6* indican que las células β pudieran estar en un estado de estrés mitocondrial y de estrés en el retículo endoplasmático.

Conclusiones Parte B

7. El factor de transcripción GATA4 es esencial para la diferenciación del epitelio glandular gástrico.
8. *Gata4* es necesario para el mantenimiento del límite anteroposterior del estómago.

9. La inactivación de *Gata4* en el epitelio glandular del estómago induce la formación de páncreas ectópico en la subserosa del estómago.
10. El páncreas ectópico de los ratones *G4KO* contiene células acinares, ductales y endocrinas.
11. La disminución de la expresión de *GATA4* pudiera estar correlacionada con la aparición de páncreas ectópico en humanos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Accili, D. *et al.* (2016) 'When β -cells fail: lessons from dedifferentiation', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18(Suppl. 1), pp. 117–122. doi: 10.1111/dom.12723.
- Acharya, J. D. and Ghaskadbi, S. S. (2010) 'Islets and their antioxidant defense', *Islets*, 2(4), pp. 225–235. doi: 10.4161/isl.2.4.12219.
- Ahlgren, U., Jonsson, J. and Edlund, H. (1996) 'The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice', *Development*, 122(5), pp. 1409–1416.
- Al-Azzeh, E. D. *et al.* (2000) 'Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1490(3), pp. 324–332. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00013-0.
- Allen, H. L. *et al.* (2012) 'GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans', *Nature Genetics*, 44(1), pp. 20–22. doi: 10.1038/ng.1035.
- Andrali, S. S. *et al.* (2008) 'Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells', *Biochemical Journal*, 415(1), pp. 1–10. doi: 10.1042/BJ20081029.
- Anello, M. *et al.* (2005) 'Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients', *Diabetologia*, 48(2), pp. 282–289. doi: 10.1007/s00125-004-1627-9.
- Apelqvist, Å., Ahlgren, U. and Edlund, H. (1997) 'Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas', *Current Biology*, 7(10), pp. 801–804. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00340-X.
- Appenzeller-Herzog, C. and Hall, M. N. (2012) 'Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling', *Trends in Cell Biology*, 22(5), pp. 274–282. doi: 10.1016/j.tcb.2012.02.006.
- Arcidiacono, B. *et al.* (2014) 'Cooperation between HMGA1, PDX-1 and MafA is essential for glucose-induced insulin transcription in pancreatic beta cells', *Frontiers in Endocrinology*, 5(DEC), pp. 1–11. doi: 10.3389/fendo.2014.00237.
- Arda, H. E., Benitez, C. M. and Kim, S. K. (2013) 'Gene regulatory networks governing pancreas development', *Developmental Cell*, 25(1), pp. 5–13. doi: 10.1016/j.devcel.2013.03.016.
- Aref, A. *et al.* (2019) 'Pancreatic transplantation: Brief review of the current evidence', *World Journal of Transplantation*, 9(4), pp. 81–93. doi: 10.5500/wjt.v9.i4.81.
- Artavanis-tsakonas, A. S. *et al.* (1999) 'Notch Signaling : Cell Fate Control and Signal Integration in Development', *Science*, 284(5415), pp. 770–776.
- Aubin, J. *et al.* (2002) 'Stomach regional specification requires Hoxa5-driven mesenchymal-epithelial signaling', *Development*, 129(17), pp. 4075–4087.
- Bachar-Wikstrom, E. *et al.* (2013) 'Improvement of ER stress-induced diabetes by stimulating autophagy', *Autophagy*, 9(4), pp. 626–628. doi: 10.4161/auto.23642.

- Le Bacquer, O. *et al.* (2013) 'mTORC1 and mTORC2 regulate insulin secretion through Akt in INS-1 cells', *Journal of Endocrinology*, 216(1), pp. 21–29. doi: 10.1530/JOE-12-0351.
- Baeyens, L. *et al.* (2016) 'β-Cell adaptation in pregnancy', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18(June), pp. 63–70. doi: 10.1111/dom.12716.
- Bailey, P. *et al.* (2016) 'Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer', *Nature*. Nature Publishing Group, 531(7592), pp. 47–52. doi: 10.1038/nature16965.
- Barrett, T. *et al.* (2013) 'NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update', *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. 991–995. doi: 10.1093/nar/gks1193.
- Bastidas-ponce, A. *et al.* (2017) 'Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development', *Development*, 144(16), pp. 2873–2888. doi: 10.1242/dev.140756.
- Bastidas-Ponce, A. *et al.* (2017) 'Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development', *Development*, 144(16), pp. 2873–2888. doi: 10.1242/dev.140756.
- Bates, D. L. *et al.* (2008) 'Crystal Structures of Multiple GATA Zinc Fingers Bound to DNA Reveal New Insights into DNA Recognition and Self-Association by GATA', *Journal of Molecular Biology*, 381, pp. 1292–1306. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.072.
- Battle, M. A. *et al.* (2008) 'GATA4 Is Essential for Jejunal Function in Mice', *Gastroenterology*, 135(5), pp. 1676–1686. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.074.
- Bell, G. I. and Polonsky, K. S. (2001) 'Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β-cell function', *Nature*, 414(6865), pp. 788–791. doi: 10.1038/414788a.
- Bellin, M. D. *et al.* (2008) 'Prolonged insulin independence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes', *American Journal of Transplantation*, 8(11), pp. 2463–2470. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02404.x.
- Bensellam, M., Jonas, J. C. and Laybutt, D. R. (2018) 'Mechanisms of β;-cell dedifferentiation in diabetes: Recent findings and future research directions', *Journal of Endocrinology*, 236(2), pp. R109–R143. doi: 10.1530/JOE-17-0516.
- Bensellam, M., Laybutt, D. R. and Jonas, J. C. (2012) 'The molecular mechanisms of pancreatic β-cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 364(1–2), pp. 1–27. doi: 10.1016/j.mce.2012.08.003.
- Beres, T. M. *et al.* (2006) 'PTF1 Is an Organ-Specific and Notch-Independent Basic Helix-Loop-Helix Complex Containing the Mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or Its Parologue, RBP-L', *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), pp. 117–130. doi: 10.1128/mcb.26.1.117-130.2006.
- Bernard-Kargar, C. *et al.* (2001) 'Sialylated form of the neural cell adhesion molecule (NCAM): A new tool for the identification and sorting of β-cell subpopulations with different functional activity', *Diabetes*, 50(SUPPL. 1), pp. 125–130.

- Beuling, E. *et al.* (2008) 'GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors', *Developmental Biology*, 322(1), pp. 179–189. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.07.022.
- Beuling, E. *et al.* (2011) 'GATA factors regulate proliferation, differentiation, and gene expression in small intestine of mature mice', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 140(4), pp. 1219–1229.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.033.
- Beuling, E. *et al.* (2012) 'GATA6 Is Required for Proliferation, Migration, Secretory Cell Maturation, and Gene Expression in the Mature Mouse Colon', *Molecular and Cellular Biology*, 32(17), pp. 3392–3402. doi: 10.1128/mcb.00070-12.
- Bindokas, V. P. *et al.* (2003) 'Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans', *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 9796–9801. doi: 10.1074/jbc.M206913200.
- Bitgood, M. J. and McMahon, A. P. (1995) 'Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo', *Developmental Biology*, 172(1), pp. 126–138. doi: 10.1006/dbio.1995.0010.
- Bjerknes, M. and Cheng, H. (2002) 'Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(3), pp. G767–G777. doi: 10.1152/ajpgi.00415.2001.
- Blandino-Rosano, M. *et al.* (2017) 'Loss of mTORC1 signalling impairs β -cell homeostasis and insulin processing', *Nature Communications*, 8(May), pp. 1–15. doi: 10.1038/ncomms16014.
- Bleuming, S. A. *et al.* (2007) 'Bone morphogenetic protein signaling suppresses tumorigenesis at gastric epithelial transition zones in mice', *Cancer Research*, 67(17), pp. 8149–8155. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4659.
- Bonnefond, A. *et al.* (2012) 'GATA6 inactivating mutations are associated with heart defects and, inconsistently, with pancreatic agenesis and diabetes', *Diabetologia*, 55(10), pp. 2845–2847. doi: 10.1007/s00125-012-2645-7.
- Bosco, D. *et al.* (2010) 'Unique arrangement of α - and β -cells in human islets of Langerhans', *Diabetes*, 59(5), pp. 1202–1210. doi: 10.2337/db09-1177.
- Bosco, D., Rouiller, D. G. and Halban, P. A. (2007) 'Differential expression of E-cadherin at the surface of rat β -cells as a marker of functional heterogeneity', *Journal of Endocrinology*, 194(1), pp. 21–29. doi: 10.1677/JOE-06-0169.
- Bossard, P. and Zaret, K. S. (1998) 'GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation.', *Development*, 125(24), pp. 4909–4917. doi: VL - 125.
- Bosse, T. *et al.* (2006) 'Gata4 Is Essential for the Maintenance of Jejunal-Ileal Identities in the Adult Mouse Small Intestine', *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), pp. 9060–9070. doi: 10.1128/MCB.00124-06.
- Bottino, R. *et al.* (2004) 'Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment', *Diabetes*, 53(10), pp. 2559–2568. doi: 10.2337/diabetes.53.10.2559.

- Brissova, M. *et al.* (2005) 'Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(9), pp. 1087–1097. doi: 10.1369/jhc.5C6684.2005.
- Burlison, J. S. *et al.* (2008) 'Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells', *Developmental Biology*, 316(1), pp. 74–86. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.01.011.
- Cabrera, O. *et al.* (2005) 'The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function', *PNAS*, 103(7), pp. 2334–2339. doi: 10.1073/pnas.0510790103.
- Cañete, A. *et al.* (2017) 'A population of hematopoietic stem cells derives from GATA4-expressing progenitors located in the placenta and lateral mesoderm of mice', *Haematologica*, 102(4), pp. 647–655. doi: 10.3324/haematol.2016.155812.
- Canivell, S. and Gomis, R. (2014) 'Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus', *Autoimmunity Reviews*, 13(4–5), pp. 403–407. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.020.
- Cano, D. A. *et al.* (2014) 'Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(13), pp. 2383–2402. doi: 10.1007/s00018-013-1510-2.
- Capito, C. *et al.* (2013) 'Mouse muscle as an ectopic permissive site for human pancreatic development', *Diabetes*, 62(10), pp. 3479–3487. doi: 10.2337/db13-0554.
- Carrasco, M. *et al.* (2012) 'GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis', *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), pp. 3504–3515. doi: 10.1172/JCI63240.
- Catli, G. *et al.* (2013) 'A novel GATA6 mutation leading to congenital heart defects and permanent neonatal diabetes: A case report', *Diabetes and Metabolism*. Elsevier Masson SAS, 39(4), pp. 370–374. doi: 10.1016/j.diabet.2013.01.005.
- Cebola, I. *et al.* (2015) 'TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors', *Nature Cell Biology*, 17(5), pp. 615–626. doi: 10.1038/ncb3160.
- Chandan, V. S. and Wang, W. (2004) 'Pancreatic Heterotopia in the Gastric Antrum', *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 128(1), pp. 111–112.
- Chandra, R. and Liddle, R. A. (2009) 'Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion', *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(5), pp. 441–446. doi: 10.1097/MOG.0b013e32832e9c41.
- Chao, C. S. *et al.* (2015) 'Novel GATA6 mutations in patients with pancreatic agenesis and congenital heart malformations', *PLoS ONE*, 10(2), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0118449.
- Chau, G. C. *et al.* (2017) 'mTOR controls ChREBP transcriptional activity and pancreatic β cell survival under diabetic stress', *Journal of Cell Biology*, 216(7), pp. 2091–2105. doi: 10.1083/jcb.201701085.

- Chen, C. *et al.* (2017) 'Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis', *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH, 6(9), pp. 943–957. doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.019.
- Chia, C. Y. *et al.* (2019) 'GATA6 Cooperates with EOMES/SMAD2/3 to Deploy the Gene Regulatory Network Governing Human Definitive Endoderm and Pancreas Formation', *Stem Cell Reports*. Elsevier Company., 12(1), pp. 57–70. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.12.003.
- Chiang, M. K. and Melton, D. A. (2003) 'Single-cell transcript analysis of pancreas development', *Developmental Cell*, 4(3), pp. 383–393. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00035-2.
- Choi, E. *et al.* (2014) 'Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum', *Gut*, 63(11), pp. 1711–1720. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305964.
- Choi, M. Y. *et al.* (2008) 'Requirement of the Tissue-Restricted Homeodomain Transcription Factor Nkx6.3 in Differentiation of Gastrin-Producing G Cells in the Stomach Antrum', *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), pp. 3208–3218. doi: 10.1128/mcb.01737-07.
- Christodoulidis, G. *et al.* (2007) 'Heterotopic pancreas in the stomach : A case report and literature review', *World Journal of Gastroenterology*, 13(45), pp. 6098–6100.
- Cinti, F. *et al.* (2016) 'Evidence of β -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(3), pp. 1044–1054. doi: 10.1210/jc.2015-2860.
- Cnop, M. *et al.* (2014) 'RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate', *Diabetes*, 63(6), pp. 1978–1993. doi: 10.2337/db13-1383.
- Cnop, M. *et al.* (2017) 'Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells', *Molecular Metabolism*, 6(9), pp. 1024–1039. doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.001.
- Cnop, M., Foufelle, F. and Velloso, L. A. (2012) 'Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes', *Trends in Molecular Medicine*, 18(1), pp. 59–68. doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.010.
- Coffinier, C. *et al.* (1999) 'Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1 β in visceral endoderm differentiation', *Development*, 126(21), pp. 4785–4794.
- Collombat, P. *et al.* (2003) 'Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development', *Genes and Development*, 17(20), pp. 2591–2603. doi: 10.1101/gad.269003.
- Crispino, J. D. *et al.* (2001) 'Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors', *Genes & Development*, 15, pp. 839–844. doi: 10.1101/gad.875201.in.

- Cunha, D. A. *et al.* (2008) 'Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells', *Journal of Cell Science*, 121(0 14), pp. 2308–2318. doi: 10.1242/jcs.026062.Initiation.
- D'Amato, E. *et al.* (2010) 'Genetic investigation in an Italian child with an unusual association of atrial septal defect, attributable to a new familial GATA4 gene mutation, and neonatal diabetes due to pancreatic agenesis', *Diabetic Medicine*, 27(10), pp. 1195–1200. doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.03046.x.
- D'Amour, K. A. *et al.* (2006) 'Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells', *Nature Biotechnology*, 24(11), pp. 1392–1401. doi: 10.1038/nbt1259.
- Dai, C. *et al.* (2012) 'Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets', *Diabetologia*, 55(3), pp. 707–718. doi: 10.1007/s00125-011-2369-0.
- Daniely, Y. (2004) 'Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium', *AJP: Cell Physiology*, 287(1), pp. C171–C181. doi: 10.1152/ajpcell.00226.2003.
- Dean, P. *et al.* (2017) 'Pancreas transplantation', *The BMJ*, 35(7), pp. 397–403. doi: 10.1016/j.mpsur.2017.04.010.
- Decker, K. *et al.* (2006) 'Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development', *Developmental Biology*, 298(2), pp. 415–429. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.046.
- Demitrack, E. S. *et al.* (2015) 'Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function', *The EMBO Journal*, 34(20), pp. 2522–2536. doi: 10.15252/embj.201490583.
- Dodou, E., Xu, S. M. and Black, B. L. (2003) 'Mef2C Is Activated Directly By Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Proteins During Skeletal Muscle Development in Vivo', *Mechanisms of Development*, 120(9), pp. 1021–1032. doi: 10.1016/S0925-4773(03)00178-3.
- Donath, M. Y. *et al.* (2013) 'Inflammation in obesity and diabetes: Islet dysfunction and therapeutic opportunity', *Cell Metabolism*, 17(6), pp. 860–872. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.001.
- Dorrell, C. *et al.* (2011) 'Transcriptomes of the major human pancreatic cell types', *Diabetologia*, 54(11), pp. 2832–2844. doi: 10.1007/s00125-011-2283-5.
- Drewes, T. *et al.* (2015) 'Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes.', *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), pp. 925–931. doi: 10.1128/mcb.16.3.925.
- Du, A. *et al.* (2009) 'Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas', *Diabetes*, 58(9), pp. 2059–2069. doi: 10.2337/db08-0987.
- Du, A. *et al.* (2012) 'Arx is required for normal enteroendocrine cell development in mice and humans', *Developmental Biology*. Elsevier Inc., 365(1), pp. 175–188. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.024.

- Duncan, S. A. *et al.* (2006) 'Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), pp. 7598–7602. doi: 10.1073/pnas.91.16.7598.
- Ehrie, M. G. and Swartz, F. J. (1974) 'Diploid, tetraploid and octaploid beta cells in the islets of Langerhans of the normal human pancreas', *Diabetes*, 23(7), pp. 583–588. doi: 10.2337/diab.23.7.583.
- Eicher, A. K., Berns, H. M. and Wells, J. M. (2018) 'Translating Developmental Principles to Generate Human Gastric Organoids', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. Elsevier Inc, 5(3), pp. 353–363. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.014.
- Eifes, S. *et al.* (2013) 'A novel GATA6 mutation in a child with congenital heart malformation and neonatal diabetes', *Clinical Case Reports*, 1(2), pp. 86–90. doi: 10.1002/ccr3.33.
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K. and Cnop, M. (2008) 'The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus', *Endocrine Reviews*, 29(1), pp. 42–61. doi: 10.1210/er.2007-0015.
- Eizirik, D. L. and Cnop, M. (2010) 'ER stress in pancreatic β cells: The thin red line between adaptation and failure', *Science Signaling*, 3(110), p. pe7. doi: 10.1126/scisignal.3110pe7.
- Engin, F. *et al.* (2014) 'Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes', *Scientific Reports*, 4(4054), pp. 2–7. doi: 10.1038/srep04054.
- Esch, H. Van *et al.* (2000) 'GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome', *Nature*, 406, pp. 419–422.
- Esni, F. *et al.* (2004) 'Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas', *Development*, 131(17), pp. 4213–4224. doi: 10.1242/dev.01280.
- Fajans, S. S., Bell, G. I. and Polonsky, K. S. (2001) 'Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young', *New England Journal of Medicine*, 345(13), pp. 971–980.
- Farney, A. C., Sutherland, D. E. R. and Opara, E. C. (2016) 'Evolution of Islet Transplantation for the Last 30 Years', *Pancreas*, 45(1), pp. 8–20. doi: 10.1097/MPA.0000000000000391.
- Fraenkel, M. *et al.* (2008) 'mTOR Inhibition by Rapamycin Prevents β -Cell Adaptation to Hyperglycemia and Exacerbates the Metabolic State in Type 2 Diabetes', *Diabetes*, 57, pp. 945–957. doi: 10.2337/db07-0922.M.F.
- De Franco, E. *et al.* (2013) 'GATA6 mutations cause a broad phenotypic spectrum of diabetes from pancreatic agenesis to adult-onset diabetes without exocrine insufficiency', *Diabetes*, 62(3), pp. 993–997. doi: 10.2337/db12-0885.

- Freyer, L. *et al.* (2015) 'A loss-of-function and H2B-Venus transcriptional reporter allele for Gata6 in mice Early development', *BMC Developmental Biology*. BMC Developmental Biology, 15(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/s12861-015-0086-5.
- Fu, Z., Gilbert, E. R. and Liu, D. (2013) 'Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes.', *Current diabetes reviews*, 9(1), pp. 25–53.
- Fujitani, Y. *et al.* (2006) 'Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation', *Genes and Development*, 20(2), pp. 253–266. doi: 10.1101/gad.1360106.
- Fukino, N. *et al.* (2015) 'Adenocarcinoma arising from heterotopic pancreas at the third portion of the duodenum', *World Journal of Gastroenterology*, 21(13), pp. 4082–4088. doi: 10.3748/wjg.v21.i13.4082.
- Fukuda, A. *et al.* (2006) 'Ectopic pancreas formation in Hes1-knockout mice reveals plasticity of enodermal progenitors of the gut, bile duct, and pancreas', *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), pp. 1484–1493. doi: 10.1172/JCI27704.1484.
- Gannon, M., Gamer, L. W. and Wright, C. V. E. (2001) 'Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene *pdx1*', *Developmental Biology*, 238(1), pp. 185–201. doi: 10.1006/dbio.2001.0359.
- Gannon, M., Herrera, P. L. and Wright, C. V. E. (2000) 'Mosaic Cre-mediated recombination in pancreas using the *pdx-1* enhancer/promoter', *Genesis*, 26(2), pp. 143–144.
- Gao, N. *et al.* (2008) 'Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development', *Genes and Development*, 22(24), pp. 3435–3448. doi: 10.1101/gad.1752608.
- Gao, T. *et al.* (2014) 'Pdx1 maintains β cell identity and function by repressing an α cell program', *Cell Metabolism*, 19(2), pp. 259–271. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.002.
- Garg, V. *et al.* (2003) 'GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5', *Nature*, 424, pp. 443–447. doi: 10.1038/nature01820.1.
- Gasa, R. *et al.* (2004) 'Proendocrine genes coordinate the pancreatic differentiation program in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), pp. 13245–13250. doi: 10.1073/pnas.0405301101.
- Gaspar Fuentes A, Campos Tarrech JM, Fernández Burgui JL, Castells Tejón E, Ruíz Rossello J, Gómez Pérez J, A. M. J. (1973) 'Pancreatic ectopias', *Rev Esp Enferm Apar Dig*, 39, pp. 255–268.
- Gerrish, K., Van Velkinburgh, J. C. and Stein, R. (2004) 'Conserved transcriptional regulatory domains of the *pdx-1* gene', *Molecular Endocrinology*, 18(3), pp. 533–548. doi: 10.1210/me.2003-0371.
- Geske (2008) 'Fgf9 signaling regulates small intestinal elongation and mesenchymal development', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Gokhale, U. A. *et al.* (2010) 'Heterotopic Pancreas in the Stomach : A Case Report and a Brief Review of the Literature', *Journal of Pancreas*, 11(3), pp. 255–257.

- Gong, M. *et al.* (2013) 'Two novel GATA6 Mutations cause childhood-onset diabetes mellitus, pancreas malformation and congenital heart disease', *Hormone Research in Paediatrics*, 79(4), pp. 250–256. doi: 10.1159/000348844.
- Gonzalez, A. *et al.* (2013) 'Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual β -cells', *Endocrinology*, 154(10), pp. 3515–3524. doi: 10.1210/en.2013-1424.
- Goodge, K. A. and Hutton, J. C. (2000) 'Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic β -cell', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 11(4), pp. 235–242. doi: 10.1006/scdb.2000.0172.
- Gottschalk, U., Dietrich, C. F. and Jenssen, C. (2018) 'Ectopic pancreas in the upper gastrointestinal tract : Is endosonographic diagnosis reliable ? Data from the German Endoscopic Ultrasound Registry and review of the literature'. doi: 10.4103/eus.eus.
- Grainger, S., Savory, J. G. A. and Lohnes, D. (2010) 'Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium', *Developmental Biology*. Elsevier Inc., 339(1), pp. 155–165. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.12.025.
- Grapin-Botton, A. and Constam, D. (2007) 'Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation', *Mechanisms of Development*, 124(4), pp. 253–278. doi: 10.1016/j.mod.2007.01.001.
- Greeley, S. A. W. *et al.* (2011) 'Neonatal diabetes: An expanding list of genes allows for improved diagnosis and treatment', *Current Diabetes Reports*, 11(6), pp. 519–532. doi: 10.1007/s11892-011-0234-7.
- Grote, D. *et al.* (2008) 'Gata3 Acts Downstream of b-Catenin Signaling to Prevent Ectopic Metanephric Kidney Induction', *PLoS Genetics*, 4(12), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pgen.1000316.
- Gu, C. *et al.* (2010) 'Pancreatic β cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity', *Cell Metabolism*, 11(4), pp. 298–310. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.006.
- Gu, G., Dubauskaite, J. and Melton, D. A. (2002) 'Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors', *Development*, 129(10), pp. 2447–2457.
- Gu, Y. *et al.* (2011) 'Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between β -cell proliferation and cell size', *Diabetes*, 60(3), pp. 827–837. doi: 10.2337/db10-1194.
- Guillam, M., Dupraz, P. and Thorens, B. (2000) 'Glucose Uptake, Utilization, and Signaling in GLUT2-Null Islets', *Diabetes*, 49(12), pp. 1485–1491.
- Guo, S. *et al.* (2013) 'Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes', *Journal of Clinical Investigation*, 123(8), pp. 3305–3316. doi: 10.1172/JCI65390.
- Guz, Y. *et al.* (1995) 'Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in β cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny', *Development*, 121(1), pp. 11–18.

- Hald, J. *et al.* (2008) 'Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(6), pp. 587–595. doi: 10.1369/jhc.2008.950675.
- Hale, M. A. *et al.* (2005) 'The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas', *Developmental Biology*, 286(1), pp. 225–237. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.026.
- Hanley, S. C. *et al.* (2010) 'β-Cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes', *Endocrinology*, 151(4), pp. 1462–1472. doi: 10.1210/en.2009-1277.
- Hao, M. *et al.* (2005) 'Regulation of two insulin granule populations within the reserve pool by distinct calcium sources', *Journal of Cell Science*, 118(24), pp. 5873–5884. doi: 10.1242/jcs.02684.
- Harding, H. P., Zhang, Y. and Ron, D. (1999) 'Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase', *Nature*, 397(6716), pp. 271–274. doi: 10.1038/16729.
- Harrison, K. A. *et al.* (1999) 'Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice', *Nature Genetics*, 23(1), pp. 71–75. doi: 10.1038/12674.
- Hasnain, S. Z., Prins, J. B. and McGuckin, M. A. (2016) 'Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β-cell dysfunction in diabetes', *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(2), pp. R33–R54. doi: 10.1530/JME-15-0232.
- Haumaitre, C. *et al.* (2005) 'Lack of TCF2 / vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis', *PNAS*, 102(5), pp. 1490–1495. doi: doi/10.1073/pnas.0405776102.
- Haveri, H. *et al.* (2008) 'Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa', *BMC Gastroenterology*, 8(9). doi: 10.1186/1471-230X-8-9.
- He, C., Cheng, H. and Zhou, R. (2007) 'GATA family of transcription factors of vertebrates : phylogenetics and chromosomal syntený', *Journal of Bioscience*, 32, pp. 1273–1280.
- Hebrok, M. *et al.* (2000) 'Regulation of pancreas development by hedgehog signaling.', *Development (Cambridge, England)*, 127(22), pp. 4905–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11044404>.
- Hebrok, M., Kim, S. K. and Melton, D. A. (1998) 'Notochord repression of endodermal sonic hedgehog permits pancreas development', *Genes and Development*, 12(11), pp. 1705–1713. doi: 10.1101/gad.12.11.1705.
- Henry, B. M. *et al.* (2019) 'Development of the human pancreas and its vasculature — An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects', *Annals of Anatomy*, 221, pp. 115–124. doi: 10.1016/j.aanat.2018.09.008.

- Herbert, T. P. and Laybutt, D. R. (2016) 'A reevaluation of the role of the unfolded protein response in islet dysfunction: Maladaptation or a failure to adapt?', *Diabetes*, 65(6), pp. 1472–1480. doi: 10.2337/db15-1633.
- Hermann, P. C. *et al.* (2014) 'Nicotine promotes initiation and progression of KRAS-induced pancreatic cancer via gata6-dependent dedifferentiation of acinar cells in mice', *Gastroenterology*. Elsevier, Inc, 147(5), pp. 1119-1133.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.002.
- Hingorani, S. R. *et al.* (2003) 'Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse.', *Cancer cell*, 4(6), pp. 437–50.
- Hollien, J. and Weissman, J. S. (2016) 'Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs during the Unfolded Protein Response', *SCience*, 313(5783), pp. 104–107.
- Holmstrom, S. R. *et al.* (2011) 'LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function', *Genes & Development*, 25, pp. 1674–1679. doi: 10.1101/gad.16860911.released.
- Horikawa, Y. *et al.* (1997) 'Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 β gene (TCF2) associated with MODY', *Nature Genetics*, 17(4), pp. 384–385. doi: 10.1038/ng1297-384.
- Horikawa, Y. (2018) 'Maturity-onset diabetes of the young as a model for elucidating the multifactorial origin of type 2 diabetes mellitus', *Journal of Diabetes Investigation*, 9(4), pp. 704–712. doi: 10.1111/jdi.12812.
- Hörnblad, A. *et al.* (2011) 'Impaired spleen formation perturbs morphogenesis of the gastric lobe of the pancreas', *PLoS ONE*, 6(6). doi: 10.1371/journal.pone.0021753.
- Horst, D. *et al.* (2010) 'Requirement of the epithelium-specific Ets transcription factor Spdef for mucous gland cell function in the gastric antrum', *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), pp. 35047–35055. doi: 10.1074/jbc.M110.164541.
- Hotamisligil, G. S. and Erbay, E. (2008) 'Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 8, p. 923. doi: <https://doi.org/10.1038/nri2449>.
- Huang, H.-P. *et al.* (2000) 'Regulation of the Pancreatic Islet-Specific Gene BETA2 (neuroD) by Neurogenin 3', *Molecular and Cellular Biology*, 20(9), pp. 3292–3307. doi: 10.1128/mcb.20.9.3292-3307.2000.
- Huh, W. J. *et al.* (2010) 'XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum', *Gastroenterology*, 139(6), pp. 2038–2049. doi: 10.1053/j.gastro.2010.08.050.
- Hunt, R. H. *et al.* (2015) 'The stomach in health and disease', *Gut*, 64(10), pp. 1650–1668. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307595.
- Husain, S. and Thrower, E. (2009) 'Molecular and cellular regulation of pancreatic acinar cell function', *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(5), pp. 466–471. doi: 10.1097/MOG.0b013e32832ebfac.

Inaishi, J. *et al.* (2016) 'Effects of obesity and diabetes on α - and β -cell mass in surgically resected human pancreas', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(7), pp. 2863–2873. doi: 10.1210/jc.2016-1374.

International Diabetes Federation (2017) *IDF DIABETES ATLAS, IDF Diabetes Atlas, 8th edition*. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).

lype, T. *et al.* (2005) 'Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: Application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), pp. 16798–16807. doi: 10.1074/jbc.M414381200.

Jacobsen, C. M. *et al.* (2002) 'Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium', *Developmental Biology*, 241(1), pp. 34–46. doi: 10.1006/dbio.2001.0424.

Jacobsen, C. M. *et al.* (2005) 'GATA-4:FOG interactions regulate gastric epithelial development in the mouse', *Developmental Dynamics*, 234(2), pp. 355–362. doi: 10.1002/dvdy.20552.

Jacquemin, P., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G. (2003) 'The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade', *Developmental Biology*, 258(1), pp. 105–116. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00115-5.

Jae Huh, W., Mysorekar, I. U. and Mills, J. C. (2010) 'Inducible activation of Cre recombinase in adult mice causes gastric epithelial atrophy, metaplasia, and regenerative changes in the absence of "floxed" alleles', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), pp. G368–G380. doi: 10.1152/ajpgi.00021.2010.

Jeans, A. F. *et al.* (2007) 'A dominant mutation in Snap25 causes impaired vesicle trafficking, sensorimotor gating, and ataxia in the blind-drunk mouse', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), pp. 2431–2436. doi: 10.1073/pnas.0610222104.

Jennings, R. E. *et al.* (2013) 'Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment', *Diabetes*, 62(10), pp. 3514–3522. doi: 10.2337/db12-1479.

Jennings, R. E. *et al.* (2015) 'Human pancreas development', *Development*, 142(18), pp. 3126–3137. doi: 10.1242/dev.120063.

Jenny, M. *et al.* (2002) 'Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium', *EMBO Journal*, 21(23), pp. 6338–6347. doi: 10.1093/emboj/cdf649.

Jensen, J. *et al.* (2000) 'Control of endodermal endocrine development by Hes-1', *Nature Genetics*, 24, pp. 36–44.

Jensen, M. V. *et al.* (2008) 'Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(6), pp. 1287–1297. doi: 10.1152/ajpendo.90604.2008.

- Jenssen, T., Hartmann, A. and Birkeland, K. I. (2017) 'Long-term diabetes complications after pancreas transplantation', *Current Opinion in Organ Transplantation*, 22(4), pp. 382–388. doi: 10.1097/MOT.0000000000000436.
- Jeon, J. *et al.* (2009) 'Endocrine cell clustering during human pancreas development', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(9), pp. 811–824. doi: 10.1369/jhc.2009.953307.
- Jeon, M. J. *et al.* (2012) 'Mitochondrial dysfunction and activation of iNOS are responsible for the palmitate-induced decrease in adiponectin synthesis in 3T3L1 adipocytes', *Experimental and Molecular Medicine*, 44(9), pp. 562–570. doi: 10.3858/emm.2012.44.9.064.
- Ježek, P., Dlasková, A. and Plecítá-Hlavatá, L. (2012) 'Redox homeostasis in pancreatic β cells', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. doi: 10.1155/2012/932838.
- Jiang, J. Q. *et al.* (2013) 'Prevalence and spectrum of GATA5 mutations associated with congenital heart disease', *International Journal of Cardiology*, 165(3), pp. 570–573. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.039.
- Jimenez-Moreno, C. *et al.* (2015) 'A Simple High Efficiency Intra-Islet Transduction Protocol Using Lentiviral Vectors', *Current Gene Therapy*, 15(4), pp. 436–446. doi: 10.2174/1566523215666150630121557.
- Jonas, J. C. *et al.* (1999) 'Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in an animal model of diabetes', *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), pp. 14112–14121. doi: 10.1074/jbc.274.20.14112.
- Jonas, J. C. *et al.* (2001) 'High Glucose Stimulates Early Response Gene c-Myc Expression in Rat Pancreatic β Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), pp. 35375–35381. doi: 10.1074/jbc.M105020200.
- Jonckheere, N. *et al.* (2012) 'GATA-4/-6 and HNF-1/-4 families of transcription factors control the transcriptional regulation of the murine Muc5ac mucin during stomach development and in epithelial cancer cells', *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier B.V., 1819(8), pp. 869–876. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.04.003.
- Jonsson, J. *et al.* (1994) 'Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice.', *Nature*, 371(6498), pp. 606–609.
- Jørgensen, M. C. *et al.* (2018) 'Neurog3-dependent pancreas dysgenesis causes ectopic pancreas in Hes1 mutant mice', *Development*, 145(17), p. dev163568. doi: 10.1242/dev.163568.
- Jouvet, N. and Estall, J. L. (2017) 'The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis', *Experimental Cell Research*, 360(1), pp. 19–23. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.050.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Tomita, K. (2000) 'The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types', *Molecules and Cells*, 10(1), pp. 1–7. doi: 10.1007/s10059-000-0001-0.

- Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M. (2006) 'Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes', *Nature*, 444(7121), pp. 840–846. doi: 10.1038/nature05482.
- Kaneto, H. *et al.* (1999) 'Beneficial effects of antioxidants in diabetes: Possible protection of pancreatic β -cells against glucose toxicity', *Diabetes*, 48(12), pp. 2398–2406. doi: 10.2337/diabetes.48.12.2398.
- Kaneto, H. and Matsuoka, T. A. (2015) 'Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature β -cell function', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), pp. 6281–6297. doi: 10.3390/ijms16036281.
- Karaca, M. *et al.* (2009) 'Exploring functional β -cell heterogeneity in vivo using PSA-NCAM as a specific marker', *PLoS ONE*, 4(5), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0005555.
- Karam, S. M. (1998) 'Cell lineage relationship in the stomach of normal and genetically manipulated mice', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(2), pp. 271–279. doi: 10.1590/S0100-879X1998000200010.
- Karaskov, E. *et al.* (2006) 'Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic β -cell apoptosis', *Endocrinology*, 147(7), pp. 3398–3407. doi: 10.1210/en.2005-1494.
- Kataoka, K. *et al.* (2002) 'MafA is a glucose-regulated and pancreatic β -cell-specific transcriptional activator for the insulin gene', *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), pp. 49903–49910. doi: 10.1074/jbc.M206796200.
- Katsuura, G., Asakawa, A. and Inui, A. (2002) 'Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake', *Peptides*, 23(2), pp. 323–329. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00604-0.
- Kaufman, C. K. *et al.* (2003) 'GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin', *Genes & Development*, 17, pp. 2108–2122. doi: 10.1101/gad.1115203.teraction.
- Kawaguchi, Y. *et al.* (2002) 'The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors', *Nature Genetics*, 32(1), pp. 128–134. doi: 10.1038/ng959.
- Kawahira, H. (2003) 'Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development', *Development*, 130(20), pp. 4871–4879. doi: 10.1242/dev.00653.
- Keane, K. N. *et al.* (2015) 'Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. doi: 10.1155/2015/181643.
- Keeley, T. M. and Samuelson, L. C. (2010) 'Cytodifferentiation of the postnatal mouse stomach in normal and Huntingtin-interacting protein 1-related-deficient mice', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(6), pp. G1241–G1251. doi: 10.1152/ajpgi.00239.2010.

- Ketola, I. *et al.* (2003) 'Transcription factor GATA-6, cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax in human fetal testis', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(4), pp. 1858–1865. doi: 10.1210/jc.2002-021647.
- Khan, A. and Pessin, J. (2002) 'Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways', *Diabetologia*, 45(11), pp. 1475–1483. doi: 10.1007/s00125-002-0974-7.
- Kim-Muller, J. Y. *et al.* (2016) 'Aldehyde dehydrogenase 1a3 defines a subset of failing pancreatic β cells in diabetic mice', *Nature Communications*, 7, pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms12631.
- Kim, D. W. *et al.* (2015) 'Heterotopic pancreas of the jejunum: associations between CT and pathology features', *Abdominal Imaging*, 40(1), pp. 38–45. doi: 10.1007/s00261-014-0177-y.
- Kim, S. K. and MacDonald, R. J. (2002) 'Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis', *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(5), pp. 540–547. doi: 10.1016/S0959-437X(02)00338-6.
- Kim, T. and Shivdasani, R. A. (2016) 'Stomach development, stem cells and disease', *Development*, 143, pp. 554–565. doi: 10.1242/dev.124891.
- Kirkpatrick, C. L. *et al.* (2011) 'Hepatic nuclear factor 1 α (HNF1 α) dysfunction down-regulates X-box-binding protein 1 (XBP1) and sensitizes β -cells to endoplasmic reticulum stress', *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), pp. 32300–32312. doi: 10.1074/jbc.M111.247866.
- Klob, J. (1859) 'Pancreas accessorium', *Zeitschrift der Kaiserl. Königl. Gesellschaft der Aerzte zu Wien*, 15, p. 732.
- Kohn, A. D. *et al.* (1996) 'Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation', *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), pp. 31372–31378. doi: 10.1074/jbc.271.49.31372.
- Kojima, S. *et al.* (2007) 'A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation', *Peptides*, 28(2), pp. 459–463. doi: 10.1016/j.peptides.2006.09.024.
- Kokubu, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2008) 'Mash1 is required for neuroendocrine cell development in the glandular stomach', *Genes to Cells*, 13(1), pp. 41–51. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01146.x.
- Komatsu, M. *et al.* (2013) 'Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective', *Journal of Diabetes Investigation*, 4(6), pp. 511–516. doi: 10.1111/jdi.12094.
- Kopp, J. L. *et al.* (2011) 'Sox9⁺ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas', *Development*, 138(4), pp. 653–665. doi: 10.1242/dev.056499.
- Koster, M. I. *et al.* (2004) 'P63 Is the Molecular Switch for Initiation of an Epithelial Stratification Program', *Genes and Development*, 18(2), pp. 126–131. doi: 10.1101/gad.1165104.

- Kouros-Mehr, H. *et al.* (2008) 'GATA-3 and the regulation of the mammary luminal cell fate', *Current Opinion in Cell Biology*, 20, pp. 164–170. doi: 10.1016/j.ceb.2008.02.003.
- Koutsourakis, M. *et al.* (1999) 'The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development [corrected and republished in Development 1999 May;126(9):723-32]', *Development*, 126(9), pp. 723–732.
- Kumar, M. *et al.* (2003) 'Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate', *Developmental Biology*, 259(1), pp. 109–122. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00183-0.
- Kumar, M. and Melton, D. (2003) 'Pancreas specification: A budding question', *Current Opinion in Genetics and Development*, 13(4), pp. 401–407. doi: 10.1016/S0959-437X(03)00089-3.
- Kuo, C. T. *et al.* (1997) 'GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation', *Genes & Development*, 11, pp. 1048–1060.
- Larsen, H. L. and Grapin-Botton, A. (2017) 'The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 66, pp. 51–68. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.005.
- Larsson, L. I. *et al.* (1996) 'Pancreatic-duodenal homeobox 1 -role in gastric endocrine patterning', *Mechanisms of Development*, 60(2), pp. 175–184. doi: 10.1016/S0925-4773(96)00609-0.
- Larsson, L. I. *et al.* (1998) 'Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development', *Mechanisms of Development*, 79(1–2), pp. 153–159. doi: 10.1016/S0925-4773(98)00182-8.
- Lee, C. S. *et al.* (2002) 'Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity', *Genes & Development*, 16, pp. 1488–1497. doi: 10.1101/gad.985002.tors.
- Lee, C. S. *et al.* (2005) 'Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic α -cells', *Developmental Biology*, 278(2), pp. 484–495. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.10.012.
- Lee, J. C. *et al.* (2001) 'Regulation of the Pancreatic Pro-Endocrine Gene Neurogenin3', *Diabetes*, 50, pp. 928–936.
- Lee, J. W. *et al.* (2010) 'ER stress is implicated in mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of pancreatic beta cells', *Molecules and Cells*, 30(6), pp. 545–549. doi: 10.1007/s10059-010-0161-5.
- Lee, M. *et al.* (1991) 'Cloning of the GATA-binding Protein That Regulates Endothelin-1 Gene Expression in Endothelial Cells *', *The Journal of biological chemistry*, 24(25), pp. 16188–16192.
- Lee, N. *et al.* (2010) 'Hypervascular Subepithelial Gastrointestinal Masses : CT-Pathologic Correlation', *RadioGraphics*, 30(7), pp. 1915–1935.
- Lehmann, R. *et al.* (2015) 'Glycemic control in simultaneous islet-kidney versus pancreas-kidney transplantation in type 1 diabetes: A prospective 13-year follow-up', *Diabetes Care*, 38(5), pp. 752–759. doi: 10.2337/dc14-1686.

- Leloup, C. *et al.* (2009) 'Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion', *Diabetes*, 58(3), pp. 673–681. doi: 10.2337/db07-1056.
- Lemaire, K. *et al.* (2017) 'How stable is repression of disallowed genes in pancreatic islets in response to metabolic stress?', *PloS one*, 12(8), p. e0181651. doi: 10.1371/journal.pone.0181651.
- Lemaire, K., Thorrez, L. and Schuit, F. (2016) 'Disallowed and Allowed Gene Expression: Two Faces of Mature Islet Beta Cells', *Annual Review of Nutrition*, 36(1), pp. 45–71. doi: 10.1146/annurev-nutr-071715-050808.
- Lentjes, M. H. *et al.* (2016) 'The emerging role of GATA transcription factors in development and disease', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 18, pp. 1–15. doi: 10.1017/erm.2016.2.
- Lenzen, S. (2008) 'Oxidative stress: the vulnerable β -cell', *Biochemical Society Transactions*, 36(3), pp. 343–347. doi: 10.1042/BST0360343.
- Leung, Y. M. *et al.* (2007) 'SNAREing voltage-gated K⁺ and ATP-sensitive K⁺ channels: Tuning β -cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins', *Endocrine Reviews*, 28(6), pp. 653–663. doi: 10.1210/er.2007-0010.
- Li, H. *et al.* (1999) 'Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9', *Nature Genetics*, 23(1), pp. 67–70. doi: 10.1038/12669.
- Lickert, H. *et al.* (2001) 'Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development', *Mechanisms of Development*, 105(1–2), pp. 181–184. doi: 10.1016/S0925-4773(01)00390-2.
- Liu, M. *et al.* (2015) 'INS-gene mutations: From genetics and beta cell biology to clinical disease', *Molecular Aspects of Medicine*, 42, pp. 3–18. doi: 10.1016/j.mam.2014.12.001.
- Lorberbaum, D. S. and Sussel, L. (2017) 'Gotta Have GATA for Human Pancreas Development', *Cell Stem Cell*, 20(5), pp. 577–579. doi: 10.1016/j.stem.2017.04.004.
- Lu, H. *et al.* (2010) 'Molecular and Metabolic Evidence for Mitochondrial Defects Associated With β -Cell Dysfunction in a Mouse Model of Type 2 Diabetes', *Diabetes*, 59(2), pp. 448–459. doi: 10.2337/db09-0129.
- Lu, J. *et al.* (1999) 'FOG-2, a Heart- and Brain-Enriched Cofactor for GATA Transcription Factors', *Molecular and Cellular Biology*, 19(6), pp. 4495–4502. doi: 10.1128/mcb.19.6.4495.
- Lynn, F. C. *et al.* (2007) 'Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), pp. 10500–10505. doi: 10.1073/pnas.0704054104.
- Lyttle, B. M. *et al.* (2008) 'Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas', *Diabetologia*, 51(7), pp. 1169–1180. doi: 10.1007/s00125-008-1006-z.

- Maassen, J. A. *et al.* (2006) 'Mitochondrial diabetes and its lessons for common Type 2 diabetes', *Biochemical Society Transactions*, 34(5), pp. 819–823. doi: 10.1042/BST0340819.
- Maestro, M. A. *et al.* (2003) 'Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas', *Human Molecular Genetics*, 12(24), pp. 3307–3314. doi: 10.1093/hmg/ddg355.
- Malhotra, J. D. and Kaufman, R. J. (2007) 'Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword?', *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), pp. 2277–2294. doi: 10.1089/ars.2007.1782.
- Malhotra, J. D. and Kaufman, R. J. (2011) 'ER stress and Its functional link to mitochondria: Role in cell survival and death', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(9), pp. 1–13. doi: 10.1101/cshperspect.a004424.
- Marchetti, P. *et al.* (2004) 'Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(11), pp. 5535–5541. doi: 10.1210/jc.2004-0150.
- Marciniak, S. J. *et al.* (2004) 'CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum', *Genes and Development*, 18(24), pp. 3066–3077. doi: 10.1101/gad.1250704.
- Marselli, L. *et al.* (2014) 'Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes?', *Diabetologia*, 57(2), pp. 362–365. doi: 10.1007/s00125-013-3098-3.
- Martin, D. I. K. and Orkin, S. H. (1990) 'Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1 / NF-E1 / Eryf 1', *Genes & Development*, 4, pp. 1886–1898.
- Martinelli, P. *et al.* (2013) 'Gata6 is required for complete acinar differentiation and maintenance of the exocrine pancreas in adult mice', *Gut*, 62(10), pp. 1481–1488. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303328.
- Martinelli, P. *et al.* (2016) 'The acinar regulator Gata6 suppresses KRasG12V-driven pancreatic tumorigenesis in mice', *Gut*, 65(3), pp. 476–486. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308042.
- Martinelli, P. *et al.* (2017) 'GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer', *Gut*, 66(9), pp. 1665–1676. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311256.
- Mastracci (2008) 'Nkx2.2 and Arx genetically interact to regulate pancreatic endocrine cell development and endocrine hormone expression', *Developmental Biology*, 359(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Mastracci, T. L. *et al.* (2013) 'Regulation of Neurod1 Contributes to the Lineage Potential of Neurogenin3+ Endocrine Precursor Cells in the Pancreas', *PLoS Genetics*, 9(2), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pgen.1003278.
- Masui, T. *et al.* (2008) 'Transcriptional Autoregulation Controls Pancreatic Ptf1a Expression during Development and Adulthood', *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), pp. 5458–5468. doi: 10.1128/mcb.00549-08.

- Matsuoka, T. *et al.* (2004) 'The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), pp. 2930–2933. doi: 10.1073/pnas.0306233101.
- Matsuyama, M., Aizawa, S. and Shimono, A. (2009) 'Sfrp controls apicobasal polarity and oriented cell division in developing gut epithelium', *PLoS Genetics*, 5(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1000427.
- Mccracken, K. W. and Wells, J. M. (2018) 'Mechanisms of embryonic stomach development', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 66, pp. 36–42. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.02.004.Mechanisms.
- McDonald, S. A. C. *et al.* (2008) 'Mechanisms of Field Cancerization in the Human Stomach: The Expansion and Spread of Mutated Gastric Stem Cells', *Gastroenterology*, 134(2), pp. 500–510. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.035.
- McGuckin, M. A. *et al.* (2011) 'Mucin dynamics and enteric pathogens', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 9, p. 265. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>.
- Meigs, J. B. *et al.* (2006) 'Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(8), pp. 2906–2912. doi: 10.1210/jc.2006-0594.
- Mellitzer, G. *et al.* (2006) 'IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas', *EMBO Journal*, 25(6), pp. 1344–1352. doi: 10.1038/sj.emboj.7601011.
- Molkentin, J. D. *et al.* (1997) 'Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis', *Genes and Development*, 11(8), pp. 1061–1072. doi: 10.1101/gad.11.8.1061.
- Molkentin, J. D. (2002) 'The Zinc Finger-containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6', *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), pp. 38949–38952. doi: 10.1074/jbc.r000029200.
- Moore, B. D. *et al.* (2016) 'Transcriptional regulation of X-Box-binding protein One (XBP1) by hepatocyte nuclear factor 4- (HNF4-) Is vital to beta-cell function', *Journal of Biological Chemistry*, 291(12), pp. 6146–6157. doi: 10.1074/jbc.M115.685750.
- Morrissey, E. E. *et al.* (1997) 'GATA-4 Activates Transcription Via Two Novel Domains That Are Conserved within the GATA-4 / 5 / 6 Subfamily *', *The Journal of biological chemistry*, 272(13), pp. 8515–8524.
- Morrissey, E. E. *et al.* (1998) 'GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo', *Genes & Development*, 12, pp. 3579–3590.
- Mortelé KJ, Rocha TC, Streeter JL, T. A. (2006) 'Multimodality Imaging of Pancreatic and Biliary Congenital Anomalies', *RadioGraphics*, 26(3), pp. 715–731.
- Mulholland, K. C. *et al.* (2004) 'Pseudocyst formation in gastric ectopic pancreas', *Journal of the Pancreas*, 5(6), pp. 498–501.

- Munoz-Bravo, J. L. *et al.* (2013) 'GDNF is required for neural colonization of the pancreas', *Development*, 140(17), pp. 3669–3679. doi: 10.1242/dev.091256.
- Muñoz-Bravo, J. L. *et al.* (2013) 'GDNF is required for neural colonization of the pancreas', *Development*, 140(17), pp. 3669–3679. doi: 10.1242/dev.091256.
- Muoio, D. M. and Newgard, C. B. (2008) 'Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 9, p. 193. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2327>.
- Mushiake, S. *et al.* (1994) 'Genes for members of the GATA-binding protein family (GATA-GT1 and GATA-GT2) together with H⁺/K⁺-ATPase are specifically transcribed in gastric parietal cells', *FEBS Letters*, 340, pp. 117–120.
- Nakajima, S. *et al.* (2011) 'Selective Abrogation of BiP/GRP78 Blunts Activation of NF- κ B through the ATF6 Branch of the UPR: Involvement of C/EBP and mTOR-Dependent Dephosphorylation of Akt', *Molecular and Cellular Biology*, 31(8), pp. 1710–1718. doi: 10.1128/mcb.00939-10.
- Nakhai, H. *et al.* (2007) 'Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina', *Development*, 134(6), pp. 1151–1160. doi: 10.1242/dev.02781.
- Nardelli, J. *et al.* (1999) 'Expression and Genetic Interaction of Transcription Factors GATA-2 and GATA-3 during Development of the Mouse Central Nervous System', *Developmental Biology*, 210, pp. 305–321.
- Nemer, G. and Nemer, M. (2003) 'Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6', *Developmental Biology*, 254(1), pp. 131–148. doi: 10.1016/S0012-1606(02)00026-X.
- Newgard, C. B. *et al.* (2009) 'A BCAA Related Metabolic Signature that differentiates obese and lean', *Cell Metabolism*, 9(4), pp. 311–326. doi: 10.1016/j.cmet.2009.02.002.A.
- Newsholme, P. *et al.* (2012) 'Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: A critical role for amino acids', *Journal of Endocrinology*, 214(1), pp. 11–20. doi: 10.1530/JOE-12-0072.
- Nichols, K. E. *et al.* (2000) 'Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1', *Nature Genetics*, 24, pp. 266–270.
- Nielsen, J. H. (2016) 'Beta cell adaptation in pregnancy: a tribute to Claes Hellerström', *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 121(2), pp. 151–154. doi: 10.3109/03009734.2016.1165776.
- Nishi, T. *et al.* (1997) 'Transcriptional activation of H⁺/K⁺-ATPase genes by gastric GATA binding proteins', *Journal of Biochemistry*, 121(5), pp. 922–929. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021674.
- Nomura, S. *et al.* (1998) 'Lineage and clonal development of gastric glands', *Developmental Biology*, 204(1), pp. 124–135. doi: 10.1006/dbio.1998.9055.

- Novials, A., Montane, J. and Cadavez-Trigo, L. (2014) 'Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes', *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, p. 25. doi: 10.2147/dmso.s37649.
- Nyeng, P. *et al.* (2007) 'FGF10 signaling controls stomach morphogenesis', *Developmental Biology*, 303(1), pp. 295–310. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.017.
- O'Sullivan-Murphy, B. and Urano, F. (2012) 'ER stress as a trigger for b-cell dysfunction and autoimmunity in type 1 diabetes', *Diabetes*, 61(4), pp. 780–781. doi: 10.2337/db12-0091.
- Offield, M. F. *et al.* (1996) 'PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum', *Development*, 122, pp. 983–995.
- Oliver-Krasinski, J. M. *et al.* (2009) 'The diabetes gene Pdx1 regulates the transcriptional network of pancreatic endocrine progenitor cells in mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7), pp. 1888–1898. doi: 10.1172/JCI37028.1888.
- Ormarsson, O. T., Gudmundsdottir, I. and Mårvik, R. (2006) 'Diagnosis and treatment of gastric heterotopic pancreas', *World Journal of Surgery*, 30(9), pp. 1682–1689. doi: 10.1007/s00268-005-0669-6.
- Öström, M. *et al.* (2008) 'Retinoic acid promotes the generation of pancreatic endocrine progenitor cells and their further differentiation into β -cells', *PLoS ONE*, 3(7), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0002841.
- Padmasekar, M. *et al.* (2013) 'Exendin-4 protects hypoxic islets from oxidative stress and improves islet transplantation outcome', *Endocrinology*, 154(4), pp. 1424–1433. doi: 10.1210/en.2012-1983.
- Pagliuca, F. W. *et al.* (2014) 'Generation of functional human pancreatic β cells in vitro', *Cell*, 159(2), pp. 428–439. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
- Pan, F. C. and Wright, C. (2011) 'Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland', *Developmental Dynamics*, 240(3), pp. 530–565. doi: 10.1002/dvdy.22584.
- Park, E. *et al.* (2014) 'Heterotopic Pancreas in Omphalomesenteric Duct Remnant Results in Persistent Umbilical Discharge', *The Korean Journal of Pathology*, 48, pp. 323–326. doi: <http://dx.doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2014.48.4.323>.
- Park, S. H. *et al.* (2000) 'Heterotopic pancreas of the stomach : CT findings correlated with pathologic findings in six patients', *Abdominal Imaging*, 25, pp. 119–123. doi: 10.1007/s002619910028.
- Park, S. H. *et al.* (2011) 'Endosonographic findings of gastric ectopic pancreas : A single center experience', 26, pp. 1441–1446. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06764.x.
- Pascal, S. M. A. *et al.* (2008) 'Effects of c-MYC activation on glucose stimulus-secretion coupling events in mouse pancreatic islets', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(1), pp. 92–102. doi: 10.1152/ajpendo.90235.2008.
- Pende, M. *et al.* (2000) 'Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished β -cell size in S6K1-deficient mice', *Nature*, 408(6815), pp. 994–997. doi: 10.1038/35050135.

- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), pp. 16–21.
- Pi, J. *et al.* (2007) 'Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion', *Diabetes*, 56(7), pp. 1783–1791. doi: 10.2337/db06-1601.
- Piccand, J. *et al.* (2014) 'Rfx6 Maintains the Functional Identity of Adult Pancreatic β Cells', *Cell Reports*, 9(6), pp. 2219–2232. doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.033.
- Pipeleers, D. *et al.* (2017) 'Heterogeneity in the Beta-Cell Population: a Guided Search Into Its Significance in Pancreas and in Implants', *Current Diabetes Reports*, 17(10), pp. 1–7. doi: 10.1007/s11892-017-0925-9.
- Piper, K. *et al.* (2004) 'Beta cell differentiation during early human pancreas development', *Journal of Endocrinology*, 181(1), pp. 11–23. doi: 10.1677/joe.0.1810011.
- Pirot, P. *et al.* (2007) 'Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs', *Diabetologia*, 50(5), pp. 1006–1014. doi: 10.1007/s00125-007-0609-0.
- Polak, M. *et al.* (2000) 'Early pattern of differentiation in the human pancreas', *Diabetes*, 49(2), pp. 225–232. doi: 10.2337/diabetes.49.2.225.
- Posselt, A. M. *et al.* (2010) 'Islet transplantation in type 1 diabetics using an immunosuppressive protocol based on the anti-LFA-1 antibody efalizumab', *American Journal of Transplantation*, 10(8), pp. 1870–1880. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03073.x.
- Del Prato, S. (2009) 'Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies', *Diabetic Medicine*, 26(12), pp. 1185–1192. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02847.x.
- Puri, S. *et al.* (2013) 'Elimination of Von Hippel-Lindau Function Perturbs Pancreas Endocrine Homeostasis in Mice', *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0072213.
- Qin, L. *et al.* (2010) 'ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy', *Autophagy*, 6(2), pp. 239–247. doi: 10.4161/auto.6.2.11062.
- Que, J. *et al.* (2007) 'Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm', *Development*, 134(13), pp. 2521–2531. doi: 10.1242/dev.003855.
- Que, J. *et al.* (2009) 'Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea', *Development*, 136(11), pp. 1899–1907. doi: 10.1242/dev.034629.
- Raghoebir, L. *et al.* (2012) 'SOX2 redirects the developmental fate of the intestinal epithelium toward a premature gastric phenotype', *Journal of Molecular Cell Biology*, 4(6), pp. 377–385. doi: 10.1093/jmcb/mjs030.
- Ramalho-Santos, M., Melton, D. A. and McMahon, A. P. (2000) 'Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development.', *Development*, 127(12), pp. 2763–2772.
- Ramos-Molina, B., Martin, M. G. and Lindberg, I. (2016) 'PCSK1 Variants and Human

- Obesity', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 140, pp. 47–74. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.12.001.
- Ramsey, V. G. *et al.* (2007) 'The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1', *Development*, 134(1), pp. 211–222. doi: 10.1242/dev.02700.
- Reiling, J. H. and Sabatini, D. M. (2006) 'Stress and mTOR signaling', *Oncogene*, 25(48), pp. 6373–6383. doi: 10.1038/sj.onc.1209889.
- Reiter, J. F., Kikuchi, Y. and Stainier, D. Y. R. (2001) 'Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation', *Development*, 128(1), pp. 125–135.
- Rezania, A. *et al.* (2014) 'Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells', *Nature Biotechnology*, 32(11), pp. 1121–1133. doi: 10.1038/nbt.3033.
- Ritz-Laser, B. *et al.* (2004) 'The Zinc Finger-Containing Transcription Factor Gata-4 Is Expressed in the Developing Endocrine Pancreas and Activates Glucagon Gene Expression', *Molecular Endocrinology*, 19(3), pp. 759–770. doi: 10.1210/me.2004-0051.
- Robson, S. C. *et al.* (2011) 'Deciphering c-MYC-regulated genes in two distinct tissues', *BMC Genomics*, 12(1), p. 476. doi: 10.1186/1471-2164-12-476.
- Röder, P. V *et al.* (2016) 'Pancreatic regulation of glucose homeostasis', *Experimental and Molecular Medicine*, 48(e219). doi: 10.1038/emm.2016.6.
- Rodríguez-Seguí, S., Akerman, I. and Ferrer, J. (2012) 'GATA believe it: New essential regulators of pancreas development', *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), pp. 3469–3471. doi: 10.1172/JCI65751.
- Roesch, A. *et al.* (2016) 'Phenotypic tumour cell plasticity as a resistance mechanism and therapeutic target in melanoma', *European Journal of Cancer*, 59, pp. 109–112. doi: 10.1016/j.ejca.2016.02.023.
- Rojas, A. *et al.* (2009) 'An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse Gata4 gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo.', *Developmental Dynamics*, 238(10), pp. 2588–2598. doi: 10.1002/dvdy.22091.
- Romano, R.-A. *et al.* (2012) 'ΔNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation', *Development*, 139(4), pp. 772–782. doi: 10.1242/jcs.108647.
- Ron, D. and Walter, P. (2007) 'Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, p. 519. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm2199>.
- Rorsman, P. and Ashcroft, F. M. (2017) 'Pancreatic β-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men', *Physiological Reviews*, 98(1), pp. 117–214. doi: 10.1152/physrev.00008.2017.
- Ross Laybutt, D. *et al.* (2002) 'Overexpression of c-Myc in β-cells of transgenic mice causes proliferation and apoptosis, downregulation of insulin gene expression, and diabetes', *Diabetes*, 51(6), pp. 1793–1804.

- Russ, H. A. *et al.* (2015) 'Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro', *The EMBO Journal*, 34(13), pp. 1759–1772. doi: 10.15252/embj.201591058.
- Rutter, G. A. *et al.* (2015) 'Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion', *Biochemical Journal*, 466, pp. 203–218. doi: 10.1042/BJ20141384.
- Sachdeva, M. M. *et al.* (2009) 'Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), pp. 19090–19095. doi: 10.1073/pnas.0904849106.
- Saiki, R. *et al.* (1988) 'Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with A Thermostable DNA Polymerase', *Science*, 239(4839), pp. 487–491. doi: DOI: 10.1126/science.239.4839.487.
- Sakamoto, N., Saiga, H. and Yasugi, S. (1998) 'Analysis of temporal expression pattern and cis-regulatory sequences of chicken pepsinogen A and C', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(2), pp. 420–424. doi: 10.1006/bbrc.1998.9290.
- Sartori, D. J. *et al.* (2014) 'GATA Factors Promote ER Integrity and β -Cell Survival and Contribute to Type 1 Diabetes Risk', *Molecular Endocrinology*, 28(1), pp. 28–39. doi: 10.1210/me.2013-1265.
- Schaffer, A. E. *et al.* (2010) 'Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors', *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 18(6), pp. 1022–1029. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.015.
- Scheuner, D. and Kaufman, R. J. (2008) 'The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with β -cell failure and diabetes', *Endocrine Reviews*, 29(3), pp. 317–333. doi: 10.1210/er.2007-0039.
- Schröder, M. and Kaufman, R. J. (2006) 'Divergent roles of IRE1a and PERK in the UPR', *Current molecular medicine*, 6(1), pp. 5–36. doi: 10.2174/156652406775574569.
- Schuit, F. *et al.* (2012) ' β -cell-specific gene repression: A mechanism to protect against inappropriate or maladjusted insulin secretion?', *Diabetes*, 61(5), pp. 969–975. doi: 10.2337/db11-1564.
- Seghers, V. *et al.* (2000) 'Sur1 Knockout Mice A model for K ATP channel-independent regulation of insulin secretion', *The Journal of biological chemistry*, 275(13), pp. 9270–9277. doi: 10.1074/jbc.275.13.9270.
- Seiichi, O. *et al.* (2002) 'Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes', *Journal of Clinical Investigation*, 109(4), pp. 525–532. doi: 10.1172/jci200214550.
- Seino, S., Shibasaki, T. and Minami, K. (2011) 'Dynamics of insulin secretion in obesity', *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), pp. 2118–2125. doi: 10.1172/JCI45680.2118.
- Sellick, G. S. *et al.* (2004) 'Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis', *Nature Genetics*, 36(12), pp. 1301–1305. doi: 10.1038/ng1475.

- Senoo, M. *et al.* (2007) 'p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia', *Cell*, 129(3), pp. 523–536. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.045.
- Servitja, J. M. and Ferrer, J. (2004) 'Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function', *Diabetologia*, 47(4), pp. 597–613. doi: 10.1007/s00125-004-1368-9.
- Seymour, P. A. *et al.* (2007) 'SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), pp. 1865–1870. doi: 10.1073/pnas.0609217104.
- Shapiro, A. M. J. *et al.* (2000) 'Islet transplantation in seven patients with Type I Diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen', *The New England Journal of Medicine*, 343(4), pp. 230–238.
- Shapiro, A. M. J. *et al.* (2006) 'International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation', *New England Journal of Medicine*, 355(13), pp. 1318–1330. doi: 10.1056/NEJMoa061267.
- Shaw-Smith, C. *et al.* (2014) 'GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes', *Diabetes*, 63(8), pp. 2888–2894. doi: 10.2337/db14-0061.
- Shi, Z. D. *et al.* (2017a) 'Genome Editing in hPSCs Reveals GATA6 Haploinsufficiency and a Genetic Interaction with GATA4 in Human Pancreatic Development', *Cell Stem Cell*, 20(5), pp. 675–688.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.01.001.
- Shi, Z. D. *et al.* (2017b) 'Genome Editing in hPSCs Reveals GATA6 Haploinsufficiency and a Genetic Interaction with GATA4 in Human Pancreatic Development', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 20(5), pp. 675–688.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.01.001.
- Shih, H. P., Wang, A. and Sander, M. (2013) 'Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(1), pp. 81–105. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122405.
- Shin, M. *et al.* (2006) 'FGF10 is required for cell proliferation and gland formation in the stomach epithelium of the chicken embryo', *Developmental Biology*, 294(1), pp. 11–23. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.019.
- Shin, S. S., Jeong, Y. Y. and Kang, H. K. (2007) 'Giant Heterotopic Pancreas in the Jejunal Mesentery', (November), pp. 262–263. doi: 10.2214/AJR.05.1142.
- Simon, M. C. (1995) 'Gotta have GATA', *Nature Genetics*, 11(1), pp. 9–11. doi: 10.1038/ng0995-9.
- Smith, S. B. *et al.* (2003) 'Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4', *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), pp. 38254–38259. doi: 10.1074/jbc.M302229200.
- Smith, S. B. *et al.* (2010) 'Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans', *Nature*, 463(7282), pp. 775–780. doi: 10.1038/nature08748.
- Sodhi, C. P., Li, J. and Duncan, S. A. (2006) 'Generation of mice harbouring a conditional loss-of-function allele of Gata6', *BMC Developmental Biology*, 6(19), pp. 1–6. doi: 10.1186/1471-213X-6-19.

- Solar, M. *et al.* (2009) 'Pancreatic Exocrine Duct Cells Give Rise to Insulin-Producing β Cells during Embryogenesis but Not after Birth', *Developmental Cell*, 17(6), pp. 849–860. doi: 10.1016/j.devcel.2009.11.003.
- Soriano, P. (1999) 'Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain ', *Nature Genetics*, 21(1), pp. 70–71. doi: 10.1038/5007.
- Sosa-Pineda, B. *et al.* (1997) 'The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas', *Nature*, 386(6623), pp. 399–402. doi: 10.1038/386399a0.
- Soyer, J. *et al.* (2010) 'Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development', *Development*, 137(2), pp. 203–212. doi: 10.1242/dev.041673.
- Spaeth, J. M. *et al.* (2017) 'Defining a Novel Role for the Pdx1 Transcription Factor in Islet β -Cell Maturation and Proliferation During Weaning', *Diabetes*, 66(11), pp. 2830–2839. doi: 10.2337/db16-1516.
- Spencer-Dene, B. *et al.* (2006) 'Stomach Development Is Dependent on Fibroblast Growth Factor 10/Fibroblast Growth Factor Receptor 2b-Mediated Signaling', *Gastroenterology*, 130(4), pp. 1233–1244. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.018.
- Spurr, A. R. (1969) 'A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy', *Journal of Ultrastructure Research*, 26(1–2), pp. 31–43. doi: 10.1016/S0022-5320(69)90033-1.
- Stanescu, D. E. *et al.* (2015) 'A novel mutation in GATA6 causes pancreatic agenesis', *Pediatric Diabetes*, 16(1), pp. 67–70. doi: 10.1111/pedi.12111.
- Stoffers, D. A. *et al.* (1997) 'Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence', *Nature Genetics*, 15(1), pp. 106–110. doi: 10.1038/ng0197-106.
- Stoffers, D. A. *et al.* (1999) 'Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter', *Endocrinology*, 140(11), pp. 5374–5381. doi: 10.1210/endo.140.11.7122.
- Stone, S. *et al.* (2019) 'Pancreatic stone protein/regenerating protein is a potential biomarker for endoplasmic reticulum stress in beta cells', *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), p. 5199. doi: 10.1038/s41598-019-41604-4.
- Suksomboon, N., Poolsup, N. and Sinprasert, S. (2011) 'Effects of vitamin e supplementation on glycaemic control in type 2 diabetes: Systematic review of randomized controlled trials', *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 36(1), pp. 53–63. doi: 10.1111/j.1365-2710.2009.01154.x.
- Sumazaki, R. *et al.* (2004) 'Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice', *Nature Genetics*, 36(1), pp. 83–87. doi: 10.1038/ng1273.
- Sun, J. *et al.* (2015) 'Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes', *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd, 42, pp. 105–118. doi: 10.1016/j.mam.2015.01.001.

- Supale, S. *et al.* (2012) 'Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(9), pp. 477–487. doi: 10.1016/j.tem.2012.06.002.
- Suzuki, S. *et al.* (2014) 'A case of pancreatic agenesis and congenital heart defects with a novel GATA6 nonsense mutation: Evidence of haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay', *American Journal of Medical Genetics*, 164(2), pp. 476–479. doi: 10.1002/ajmg.a.36275.
- Szot, G. L., Koudria, P. and Bluestone, J. A. (2008) 'Murine Pancreatic Islet Isolation', *Journal of Visualized Experiments*, 1640(7), pp. 7–8. doi: 10.3791/255.
- Talchai, C. *et al.* (2012) 'Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure', *Cell*, 150(6), pp. 1223–1234. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.029.
- Tanaka, Y. *et al.* (1999) 'Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), pp. 10857–10862. doi: 10.1073/pnas.96.19.10857.
- Taraviras, S. *et al.* (2000) 'Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4 γ ', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1490(1–2), pp. 21–32. doi: 10.1016/S0167-4781(99)00232-8.
- Taylor, B., Fen-Fen, L. and Sander, M. (2013) 'Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells', *Cell Reports*, 4(6), pp. 1262–1275. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.
- Teo, A. K. K. *et al.* (2018) 'Single-cell analyses of human islet cells reveal de-differentiation signatures', *Cell Death Discovery*. Springer US, 4(14). doi: 10.1038/s41420-017-0014-5.
- Tersey, S. A. *et al.* (2012) 'Islet β -cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model', *Diabetes*, 61(4), pp. 818–827. doi: 10.2337/db11-1293.
- Thomas, C. C. and Philipson, L. H. (2015) 'Update on Diabetes Classification', *Medical Clinics of North America*. Elsevier Inc, 99(1), pp. 1–16. doi: 10.1016/j.mcna.2014.08.015.
- Thomas, I. H. *et al.* (2009) 'Neonatal diabetes mellitus with pancreatic agenesis in an infant with homozygous IPF-1 Pro63fsX60 mutation', *Pediatric Diabetes*, 10(7), pp. 492–496. doi: 10.1111/j.1399-5448.2009.00526.x.
- Thompson, C. A. *et al.* (2017) 'GATA4 Is Sufficient to Establish Jejunal Versus Ileal Identity in the Small Intestine', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. Elsevier Inc, 3(3), pp. 422–446. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.009.
- Thompson, C. A., DeLaForest, A. and Battle, M. A. (2018) 'Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions', *Developmental Biology*. Elsevier Inc., 435(2), pp. 97–108. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.01.006.
- Thorens, B. (2015) 'GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis', *Diabetologia*, 58(2), pp. 221–232. doi: 10.1007/s00125-014-3451-1.

- Tiyaboonchai, A. *et al.* (2017) 'GATA6 Plays an Important Role in the Induction of Human Definitive Endoderm, Development of the Pancreas, and Functionality of Pancreatic β Cells', *Stem Cell Reports*, 8(3), pp. 589–604. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.12.026.
- Tong, X. *et al.* (2016) 'SERCA2 deficiency impairs pancreatic β -cell function in response to diet-induced obesity', *Diabetes*, 65(10), pp. 3039–3052. doi: 10.2337/db16-0084.
- Trainor, C. D. *et al.* (2000) 'JBC Papers in Press. Published on June 21, 2000 as Manuscript M000020200', (301).
- Tremblay, M., Sanchez-Ferras, O. and Bouchard, M. (2018) 'GATA transcription factors in development and disease', *Development*. The Company of Biologists, 145(20), p. dev164384. doi: 10.1242/dev.164384.
- Tsang, A. P. *et al.* (1997) 'FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation', *Cell*, 90(1), pp. 109–119. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80318-9.
- Udler, M. S. (2019) 'Type 2 Diabetes : Multiple Genes , Multiple Diseases', *Current Diabetes Reports*. Current Diabetes Reports, 19(55), pp. 1–9. doi: <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1169-7> PATHOGENESIS.
- Um, S. H. *et al.* (2004) 'Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity', *Nature*, 431(7005), pp. 200–205. doi: 10.1038/nature02866.
- Um, S. H., D'Alessio, D. and Thomas, G. (2006) 'Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1', *Cell Metabolism*, 3(6), pp. 393–402. doi: 10.1016/j.cmet.2006.05.003.
- Vanhooose, A. M. *et al.* (2008) 'MafA and MafB regulate Pdx1 transcription through the area II control region in pancreatic β cells', *Journal of Biological Chemistry*, 283(33), pp. 22612–22619. doi: 10.1074/jbc.M802902200.
- Del Vecchio, C. A. *et al.* (2014) 'De-Differentiation Confers Multidrug Resistance Via Noncanonical PERK-Nrf2 Signaling', *PLoS Biology*, 12(9). doi: 10.1371/journal.pbio.1001945.
- Verzi (2008) 'Transcription factor Foxq1 controls mucin gene expression and granule content in mouse stomach surface mucous cells', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Villamayor, L. *et al.* (2018) 'GATA6 controls insulin biosynthesis and secretion in adult β -cells', *Diabetes*, 67(3), pp. 448–460. doi: 10.2337/db17-0364.
- Villasenor, A. *et al.* (2010) 'Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis', *Development*, 137(24), pp. 4295–4305. doi: 10.1242/dev.052993.
- Walter, P. and Ron, D. (2011) 'The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation', *Science*, 334(6059), pp. 1081–1086. doi: 10.1126/science.1209038.

- Wang, J. *et al.* (2005) 'Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells', *Developmental Biology*, 286(1), pp. 182–194. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.021.
- Wang, J., Yang, X. and Zhang, J. (2016) 'Bridges between mitochondrial oxidative stress, ER stress and mTOR signaling in pancreatic β cells', *Cellular Signalling*, 28(8), pp. 1099–1104. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.05.007.
- Wang, X. *et al.* (2011) 'Residual embryonic cells as precursors of a Barrett's-like metaplasia', *Cell.*, 145(7), pp. 1023–1035. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.026.
- Wang, X. *et al.* (2019) 'Point mutations in the PDX1 transactivation domain impair human β -cell development and function', *Molecular Metabolism*, 24, pp. 80–97. doi: 10.1016/J.MOLMET.2019.03.006.
- Wang, X. and Proud, C. G. (2006) 'The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis', *Physiology*, 21(5), pp. 362–369. doi: 10.1152/physiol.00024.2006.
- Wang, Z. and Thurmond, D. C. (2009) 'Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - Roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins', *Journal of Cell Science*, 122(7), pp. 893–903. doi: 10.1242/jcs.034355.
- Watada, H. *et al.* (2003) 'Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells', *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), pp. 17130–17140. doi: 10.1074/jbc.M213196200.
- Watt, A. J. *et al.* (2007a) 'Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4', *BMC Developmental Biology*, 7, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-213X-7-37.
- Watt, A. J. *et al.* (2007b) 'Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4', *BMC Developmental Biology*, 7, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-213X-7-37.
- Weber, H. *et al.* (2000) 'A role for GATA5 in *Xenopus* endoderm specification', *Development*, 127(20), pp. 4345–4360.
- Wicksteed, B. *et al.* (2007) 'A cis-Element in the 5' Untranslated Region of the Preproinsulin mRNA (ppIGF) Is Required for Glucose Regulation of Proinsulin Translation', *Cell Metabolism*, 5(3), pp. 221–227. doi: 10.1016/j.cmet.2007.02.007.
- Wiebe, P. O. *et al.* (2007) 'Ptf1a Binds to and Activates Area III, a Highly Conserved Region of the Pdx1 Promoter That Mediates Early Pancreas-Wide Pdx1 Expression', *Molecular and Cellular Biology*, 27(11), pp. 4093–4104. doi: 10.1128/mcb.01978-06.
- Wierup, N. *et al.* (2002) 'The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas', *Regulatory Peptides*, 107(1–3), pp. 63–69. doi: 10.1016/S0167-0115(02)00067-8.
- Wijesekara, N. *et al.* (2010) 'Beta cell specific ZnT8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallization and secretion', *Diabetologia*, 53(8), pp. 1656–1668. doi: 10.1007/s00125-010-1733-9.

- Wilkinson-White, L. *et al.* (2015) 'GATA1 directly mediates interactions with closely spaced pseudopalindromic but not distantly spaced double GATA sites on DNA', *ProteinScience.org*, 24, pp. 1649–1659. doi: 10.1002/pro.2760.
- Willet, S. G. *et al.* (2014) 'Dominant and context-specific control of endodermal organ allocation by Ptf1a', *Development*, 141(22), pp. 4385–4394. doi: 10.1242/dev.114165.
- Willet, S. G. and Mills, J. C. (2016) 'Stomach organ and cell lineage differentiation: from embryogenesis to adult homeostasis', *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2(5), pp. 546–559. doi: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.05.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.05.006).
- Wulschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006) 'TOR signaling in growth and metabolism', *Cell*, 124(3), pp. 471–484. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.016.
- Xuan, S. *et al.* (2012) 'Pancreas-specific deletion of mouse Gata4 and Gata6 causes pancreatic agenesis', *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), pp. 3516–3528. doi: 10.1172/JCI63352.
- Xuan, S. and Sussel, L. (2016) 'GATA4 and GATA6 regulate pancreatic endoderm identity through inhibition of hedgehog signaling', *Development*, 143(5), pp. 780–786. doi: 10.1242/dev.127217.
- Yang, H. and Evans, T. (1992) 'Distinct Roles for the Two cGATA-1 Finger Domains', *Molecular and Cellular Biology*, 12(10), pp. 4562–4570.
- Yang, Y. *et al.* (2011) 're programming by forced Pdx1 expression', *Genes & Development*, pp. 1680–1685. doi: 10.1101/gad.16875711.from.
- Yasugi, S. and Mizuno, T. (2008) 'Molecular analysis of endoderm regionalization', *Development Growth and Differentiation*, 50(SUPPL. 1). doi: 10.1111/j.1440-169X.2008.00984.x.
- Yau, D. *et al.* (2017) 'Case report: Maternal mosaicism resulting in inheritance of a novel GATA6 mutation causing pancreatic agenesis and neonatal diabetes mellitus', *Diagnostic Pathology*. *Diagnostic Pathology*, 12(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s13000-016-0592-1.
- Yongjun, Y. *et al.* (2008) 'An FGF-WNT gene regulatory network controls lung mesenchyme development', *Developmental Biology*, 319(2), pp. 426–436. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Yorifuji, T. *et al.* (2012) 'Dominantly inherited diabetes mellitus caused by GATA6 haploinsufficiency: Variable intrafamilial presentation', *Journal of Medical Genetics*, 49(10), pp. 642–643. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101161.
- Yoshioka, M. *et al.* (1997) 'A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice', *Diabetes*, 46(5), pp. 887–894. doi: 10.2337/diab.46.5.887.
- Yu, W. Y., Slack, J. M. W. and Tosh, D. (2005) 'Conversion of columnar to stratified squamous epithelium in the developing mouse oesophagus', *Developmental Biology*, 284(1), pp. 157–170. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.04.042.

- Yuan, Z. *et al.* (2009) 'Heterotopic pancreas in the gastrointestinal tract', *World Journal of Gastroenterology*, 15(29), pp. 3701–3703. doi: 10.3748/wjg.15.3701.
- Zaret, K. S. *et al.* (2008) 'Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: Programming liver and pancreas progenitors from the endoderm', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73, pp. 119–126. doi: 10.1101/sqb.2008.73.040.
- Zaret, K. S. and Grompe, M. (2008) 'Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas', *Science*, 322(5907), pp. 1490–1494. doi: 10.1126/science.1161431.
- Zhang, H. *et al.* (2009) 'Multiple, temporal-specific roles for HNF6 in pancreatic endocrine and ductal differentiation', *Mechanisms of Development*, 126(11–12), pp. 958–973. doi: 10.1016/j.mod.2009.09.006.Multiple.
- Zhang, L. *et al.* (2007) 'Pancreatic Intraepithelial Neoplasia in Heterotopic Pancreas', *The American Journal of Surgical Pathology*, 31(8), pp. 1191–1195. doi: 10.1097/pas.0b013e31806841e1.
- Zhou, Q. *et al.* (2007) 'A Multipotent Progenitor Domain Guides Pancreatic Organogenesis', *Developmental Cell*, 13(1), pp. 103–114. doi: 10.1016/j.devcel.2007.06.001.
- Zhou, Q. *et al.* (2008) 'In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells', *Nature*, 455(7213), pp. 627–632. doi: 10.1038/nature07314.
- Zhu, Y. *et al.* (2017) 'PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: Critical transcription regulators for beta cell development and regeneration', *Stem Cell Research and Therapy*. Stem Cell Research & Therapy, 8(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s13287-017-0694-z.

VIII. ANEXOS

1. GATA6 Controls Insulin Biosynthesis and Secretion in Adult β -Cells.

Villamayor, L., Rodríguez-Seguel, E., Araujo, R., Carrasco, M., Bru-Tarí, E., Mellado-Gil, J.M., Gauthier, B.R., Martinelli, P., Quesada, I., Soria, B., Martín, F., Cano, D.A, Rojas, A. Diabetes, 2018.

2. GATA factors in pancreas development and disease

Villamayor, L., Cano, D.A., Rojas, A.

IUBMB Life, 2019.



GATA6 Controls Insulin Biosynthesis and Secretion in Adult β -Cells

Laura Villamayor,¹ Elisa Rodríguez-Seguel,¹ Raquel Araujo,^{1,2} Manuel Carrasco,¹ Eva Bru-Tarí,³ José Manuel Mellado-Gil,¹ Benoit R. Gauthier,¹ Paola Martinelli,^{4,5} Iván Quesada,^{2,3} Bernat Soria,^{1,2} Franz Martín,^{1,2} David A. Cano,⁶ and Anabel Rojas^{1,2}

Diabetes 2018;67:448–460 | <https://doi.org/10.2337/db17-0364>

GATA4 and GATA6 play essential, but redundant, roles in pancreas formation in mice, and GATA6 mutations cause pancreatic agenesis in humans. GATA6 mutations have also recently been linked to adult-onset diabetes, with subclinical or no exocrine insufficiency, suggesting an important role for GATA6 in human β -cell physiology. To investigate the role of GATA6 in the adult endocrine pancreas, we generated mice in which *Gata6* is specifically inactivated in the pancreas. These mice develop glucose intolerance. Islets deficient in GATA6 activity display decreased insulin content and impaired insulin secretion. *Gata6*-deficient β -cells exhibit ultrastructural abnormalities, including increased immature insulin granules, swollen mitochondria, and disorganized endoplasmic reticulum. We also demonstrate that *Pdx1* expression in adult β -cells depends on GATA sites in transgenic reporter mice and that loss of GATA6 greatly affects β -cell-specific gene expression. These findings demonstrate the essential role of GATA6 in β -cell function.

The formation of β -cells during embryonic development is regulated by a notable number of transcription factors that activate lineage-specific genes. Interestingly, many of these transcription factors are also important in pancreas function during adult life. Members of the GATA zinc finger transcription family are crucial for pancreas organogenesis in both human and mouse (1–3). Exome sequencing studies have

revealed that heterozygous GATA6 mutations are the most common cause of pancreatic agenesis (3,4). Mutations in GATA4 have also been linked to neonatal diabetes and pancreatic agenesis in humans (5,6). In the mouse, GATA4 and GATA6 play redundant roles in embryonic pancreas formation. Single inactivation of *Gata4* or *Gata6* in pancreatic progenitor cells does not have a major effect in pancreas organogenesis. However, the simultaneous inactivation of both *Gata4* and *Gata6* results in pancreatic agenesis due to defects in pancreatic progenitor cell proliferation and differentiation (1,2).

The expression of these two GATA transcription factors is not restricted to the embryonic stages of pancreas formation. Thus, in the adult pancreas, *Gata4* is expressed in the acinar compartment, whereas *Gata6* is expressed in the endocrine and exocrine compartments. Interestingly, recent genetic studies have revealed that GATA6 mutations are also linked to adult-onset diabetes with subclinical or no exocrine insufficiency. Moreover, GATA6 deficiency in human pluripotent stem cells altered in vitro directed differentiation toward β -like cells as well as their subsequent functionality (7–9). Taken together, these studies indicate that in addition to pancreas development, GATA6 plays a critical role in β -cell function that remains uncharted. Here, we thoroughly analyze mice with single inactivation of *Gata6* in the pancreas. We show that although *Gata6*-deficient mice are apparently normal at birth, as they age they develop glucose intolerance. Furthermore, loss of

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Universidad Pablo de Olavide, Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Seville, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain

³Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain

⁴Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain

⁵Institute for Cancer Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁶Unidad de Gestión de Endocrinología y Nutrición, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain

Corresponding author: Anabel Rojas, anabel.rojas@cabimer.es.

Received 23 March 2017 and accepted 13 December 2017.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db17-0364/-/DC1>.

© 2017 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

Gata6 causes impairment of β -cell insulin biosynthesis and secretion and markedly affects the islet transcriptome.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Mice

Gata6^{fl^{ox}/fl^{ox}}, *Pdx1*-Cre, *Pdx1*-wt-*lacZ*, and *Pdx1*-mut-*lacZ* mice have been previously described (1,10,11). All experiments using animals were approved by the University of Seville Institutional Animal Care and Use Committee, Seville, Spain.

Histology, Immunohistochemistry, and Immunofluorescence

Histological and immunohistochemical analyses were performed, as previously described (12), on at least four different sections from five different mice. Primary antibodies were used at the indicated dilution: anti-GATA6 (1:1,000, AF 1700; R&D Systems), anti-Pdx1 (1:200, ab47308; Abcam), anti-Nkx6.1 (1:50, F55A10; DSHB), anti-Nkx2.2 (1:25, 74.5A5; DSHB), anti-glucagon (1:100, G2654; Sigma-Aldrich), anti-insulin (1:500, I2018; Sigma-Aldrich), anti-GLUT2 (1:300, 07-1402; Millipore), anti- β -galactosidase (1:500, 559762; MP Biochemicals), anti-C-peptide (1:100, 05-1109; Millipore), anti-MafA (1:50; Bethyl Laboratories), anti-somatostatin (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), anti-pancreatic polypeptide (1:100; Millipore), and anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS; 1:100; Thermo Fisher Scientific).

Transmission Electron Microscopy and Insulin Granules Quantification

For transmission electronic microscopy (TEM) analysis, isolated pancreatic islets were processed using a standard Spurr protocol (13). TEM images were taken with an EMCCD camera (TRS 2k \times 2k). Quantifications of insulin granules were performed on 20 TEM images obtained from isolated islets of control and *Gata6* knockout (KO) mice ($n = 6$), as previously described (14,15), using ImageJ software.

Islets Isolation

Islets were isolated from pancreata of male *Gata6* KO and control mice by the collagenase digestion method (16). Islets were handpicked after several purification steps and used for RNA isolation or kept in culture overnight for insulin secretion tests.

Glucose and Insulin Tolerance Test

After a 16-h fast, mice were weighed, and an Accu-Chek Aviva glucometer was used to measure glucose levels. Mice were injected intraperitoneally with glucose (2 g/kg of body weight). Blood glucose levels were measured every 30 min. Blood for in vivo insulin measurements was collected from the tail vein before and at 5 and 30 min after the glucose injection. Insulin concentration was measured using the Insulin ELISA kit (Mercodia) following the manufacturer's instructions. The insulin tolerance test was performed as previously described (17).

Insulin Secretory Response

For in vitro insulin secretion, isolated islets were incubated in 2.8 mmol/L glucose or 16.7 mmol/L glucose for 1 h at 37°C. Ten matched-size islets were used per triplicate per condition. After incubation, media was collected to measure insulin using the Insulin ELISA kit (Mercodia). Islets were collected, spun down, and lysed using a 30-gauge syringe with Tris-EDTA buffer for measuring total insulin content.

C-Peptide and Proinsulin Content

Blood was collected from the tail vein of mice after a 16-h fast, and C-peptide and proinsulin levels were measured using the C-peptide ELISA kit (Crystal Chem) and Proinsulin ELISA kit (Mercodia), respectively, following the manufacturers' recommendations.

β -Cell Area Quantification

β -Cell area quantification was performed as described (18). Immunohistochemistry images were taken with a Nikon microscope and processed using ImageJ software. β -Cell area was calculated as the percentage of insulin area-to-total pancreatic area (marked by DAPI staining).

Pancreas and Islets Insulin Content

Dissected pancreata were minced using a Polytron homogenizer in Tris-EDTA buffer, and isolated islets were lysed in Tris-EDTA buffer using a 30-gauge syringe. Debris was spun down, and the supernatant was collected to measure insulin, as described above. Total pancreatic protein content and islets DNA was measured using Bradford reagent (Sigma-Aldrich) and the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay kit (Invitrogen), respectively.

Microarray Analyses and Quantitative PCR

Isolated islets from three control or three *Gata6* KO mice were pooled to obtain RNA. Total RNA was isolated using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen). Gene profile was performed in three independent pools of control and four pools of *Gata6* KO islets using the Affymetrix GeneChip Mouse Gene 2.0 ST Array. Differentially expressed genes were defined as those for which the nominal P was 0.05. Gene expression data are available through the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE106316) (19). Quantitative (q)PCR was performed from at least seven independent pools of control and *Gata6* KO islets. qPCR was performed using the following TaqMan probes (Applied Biosystems): *Ins1*: Mm01950294_s1; *Ins2*: Mm00731595_gH; *Slc2a2*: Mm00446224_m1; *Pdx1*: Mm00435565_m1; *Abcc8*: Mm00803450_m1; *Nkx6.1*: Mm00454961_m1; *Nkx2.2*: Mm03053916_s1; *Pcsk1*: Mm00479023_m1; *Gcg*: Mm00801714_m1; *Sst*: Mm00436671_m1; *Gata6*: Mm00802632_m1; *Gata4*: Mm00484689_m1; *Irs2*: Mm03038438_m1; *Cacna1c*: Mm01188822_m1; *Nos2*: Mm0040502_m1; and β -actin: Mm02619580_g1. The following primers were used to quantify gene expression by SYBR Green: *MafA*: forward 5'-GAGGAGGTCATCCGACTGAAA-3', reverse 5'-GCATTCTCGCTCTCCAGAAT-3'; *Snap25*: forward 5'-GAGAACCTGGAGCAGGTGAG-3', reverse 5'-AGCATCTTTGTTGCACGTTG-3'.

Statistical Analysis

Data in scatter plots and graph bars are presented as mean \pm SD and mean \pm SEM, respectively. The Student *t* test was performed with a level of significance of $P < 0.05$. Two-way ANOVA with repeated measures with Bonferroni correction were used to analyze intraperitoneal glucose tolerance test data.

RESULTS

Pancreas-Specific Inactivation of *Gata6* Leads to Glucose Intolerance With Aging

To elucidate the role of GATA6 in β -cell function, we generated pancreas-specific *Gata6* KO mice by crossing mice with a conditional (*flox*) allele of *Gata6* (*Gata6^{flox/flox}*) with mice that express the Cre recombinase under the control of the *Pdx1* promoter (*Pdx1-Cre* mice) (1). Efficient *Gata6* inactivation in the pancreas was demonstrated by immunohistochemistry and qPCR (Fig. 1A–C). Clear elimination of GATA6 was observed in exocrine and islet cells of *Gata6^{flox/flox}; Pdx1-Cre* mice (*Gata6* KO mice, hereafter) (Fig. 1B). Gross morphology and histological analysis did not reveal any apparent pancreatic abnormalities in newborn (Fig. 1D and E) or 2-month-old (Fig. 1F and G) *Gata6* KO mice. As mice aged, we observed mild loss of acinar cells, acinar- to ductal-metaplasia lesions, and pancreatic lipomatosis in *Gata6* KO mice (Fig. 2H–O), in agreement with previous studies describing GATA6 as an essential factor for the maintenance of acinar identity (20). However, acinar cell morphology was not largely disrupted, as assessed by cell polarity markers (Supplementary Fig. 1). Similarly, overall exocrine pancreatic function was not compromised, as determined by plasma amylase activity (Supplementary Fig. 1). Histological (Fig. 2A and H) and immunohistochemical analysis for pancreatic hormones revealed that although the overall architecture of *Gata6* KO islets was not markedly affected, insulin levels appeared lower in *Gata6*-deficient β -cells (Fig. 2C–H). To determine the functional requirement for GATA6 in the adult endocrine pancreas, we examined glucose homeostasis in *Gata6* KO mice. Male and female *Gata6* KO mice at 2 and 4 months old displayed normal glucose tolerance (Fig. 3A–D and Supplementary Fig. 2). However, by age 6 months, male and female *Gata6* KO mice displayed a significant impairment in glucose tolerance compared with control mice (Fig. 3E and F and Supplementary Fig. 2), a phenotype that was maintained at 12 months of age (Fig. 3G and H). Despite the abnormal glucose tolerance, no differences in basal glycemia under fasting conditions were observed between *Gata6* KO and control mice (Fig. 3I). Because *Gata6^{flox/flox}*, *Gata6^{flox/+}*; *Pdx1-Cre*, *Gata6^{flox/+}*, and *Pdx1-Cre* mice exhibited similar phenotypes in glucose tolerance (Supplementary Fig. 3), we only included *Gata6^{flox/flox}* littermates as controls in all subsequent experiments. The glucose intolerance phenotype of *Gata6* KO mice was not associated to insulin resistance, as shown by insulin tolerance tests (Fig. 3J). Thus, our data indicate that *Gata6* inactivation in the pancreas compromises glucose homeostasis.

Gata6 KO Mice Display Reduced Pancreatic Insulin Content and Defects in Insulin Secretion

The glucose intolerance phenotype observed in 6-month-old *Gata6* KO mice could be due to decreased β -cell numbers. Nonetheless, quantification of β -cell area did not reveal significant differences between 6-month-old *Gata6* KO and control littermates (Fig. 4A). Similarly, no differences in β -cell apoptosis and proliferation were observed between *Gata6* KO and control islets (Supplementary Fig. 4). Because immunofluorescence analysis revealed a potential reduction in insulin accumulation in β -cells (Fig. 2C–H), we measured total pancreatic insulin content. A significant decrease in insulin levels was observed in the *Gata6* KO pancreas compared with the control pancreas (Fig. 4B). Moreover, the insulin content of isolated *Gata6* KO islets was reduced by 2.5-fold compared with isolated control islets (Fig. 4C).

We next investigated whether *Gata6* inactivation affected insulin secretion. To this aim, we measured circulating insulin levels in 6-month-old mice subsequent to an intraperitoneal glucose tolerance test. *Gata6* KO mice exhibited impaired insulin secretion under basal conditions and upon glucose challenge (Fig. 4D). To directly analyze β -cell function, insulin secretion assays were performed on islets isolated from 6-month-old control and *Gata6* KO mice. Similar to what we observed in vivo, insulin secretion from *Gata6* KO islets was reduced compared with control islets under basal and high glucose concentrations (Fig. 4E). Nonetheless, the difference between basal and high glucose was maintained in *Gata6*-deficient compared with control islets, suggesting a dampened yet preserved glucose-induced insulin response (Fig. 4E). To confirm these findings, we measured intracellular calcium flux in isolated islets at different glucose concentrations using fluorescent calcium fluorescence sensor Fura-2. No marked differences between *Gata6* KO and control islets were observed (Supplementary Fig. 5). Altogether, our results indicate that the glucose intolerance phenotype of *Gata6* KO mice might be due to defects in both insulin production and secretion.

Key Genes in Insulin Biosynthesis and Secretion Are Downregulated in *Gata6*-Deficient Islets

To gain insight into the role of GATA6 in islet function, we performed microarray analysis comparing *Gata6* KO and control islets. To avoid any potential interference of glucose intolerance in islet expression, gene expression was analyzed in islets collected from 2-month-old mice when they still display normal glucose tolerance. The most downregulated genes were genes involved in different aspects of β -cell function, such as glucose sensing (*Slc2a2*, encoding for GLUT2 transporter), insulin biosynthesis (*Pcsk1*), insulin secretion (*Abcc8*; *Cacna1c*; SNAP-25), and major transcriptional regulators of adult β -cell function such as *Pdx1*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, and *MafA* (21–24). Insulin transcripts (both *Ins1* and *Ins2*) of *Gata6* KO islets also displayed a notable decrease compared with control islets, in agreement with the observed reduction in pancreatic and islet insulin content observed in 6-month-old mice (Fig. 2B and C). Gene

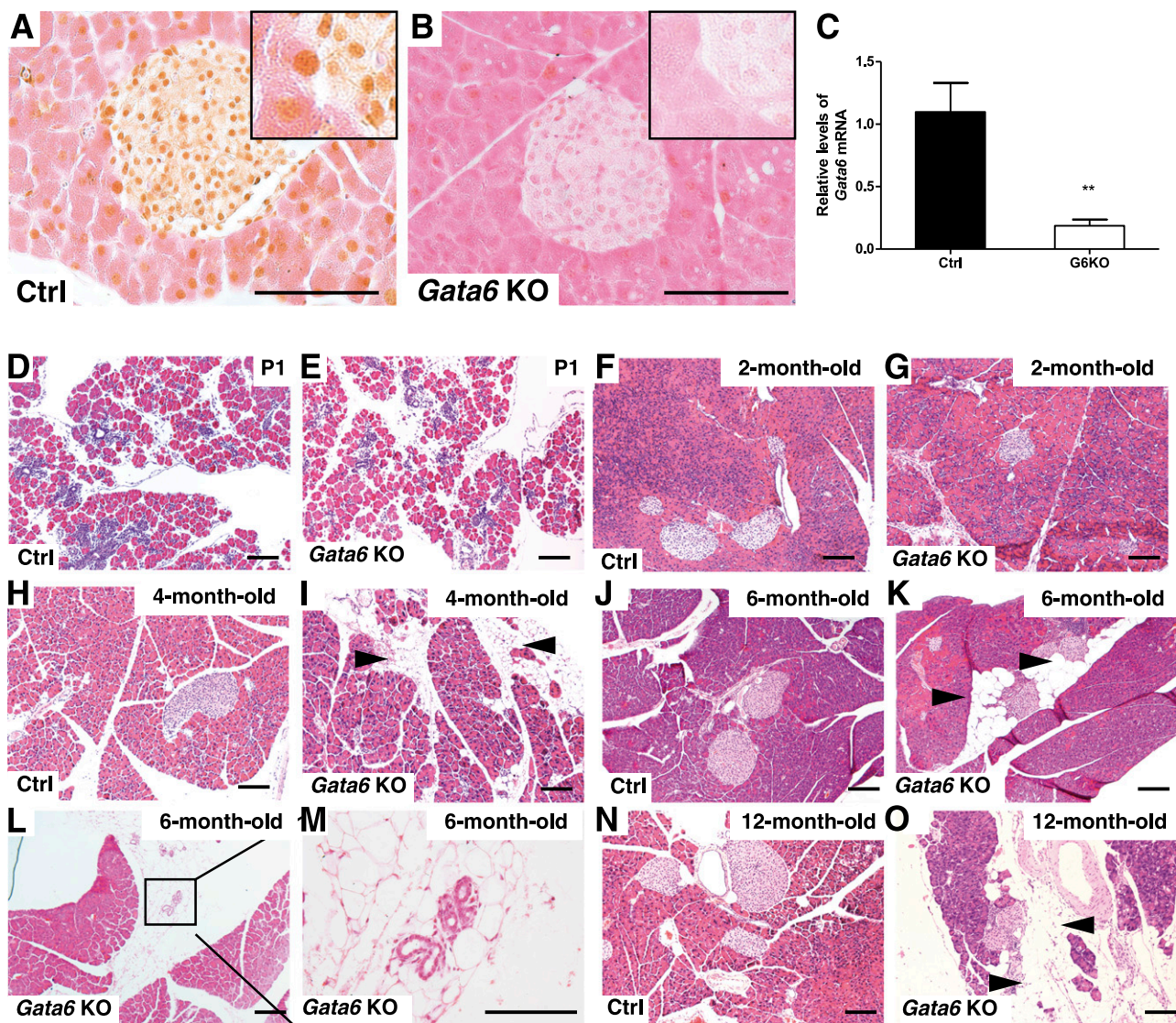


Figure 1—*Gata6*-deficient pancreata have disrupted acinar compartment but normal islet architecture. **A**: Immunohistochemistry analysis on pancreatic sections using an anti-GATA6 antibody reveal robust nuclear GATA6 protein in both acinar and islet tissue in 2-month-old control (Ctrl) mice. Efficient inactivation of *Gata6* floxed allele is demonstrated by the lack of GATA6 protein in the endocrine and exocrine pancreatic compartments of *Gata6* KO (G6KO) mice (**B**) and by the decrease of GATA6 transcripts measured by qPCR using TaqMan probes (**C**). Insets in **A** and **B** are magnifications of selected areas. Values are mean \pm SEM for $n = 7$ pools of islets for each group (each pool contains islets from three mice). Statistical significance between groups was determined by Student *t* test. $^{**}P < 0.01$. **D–O**: Hematoxylin and eosin staining of G6KO and Ctrl pancreatic sections of mice at postnatal day 1 (P1) and at 2, 4, 6, and 12 months of age are shown. Acinar tissue of G6KO pancreata is focally replaced by adipose as early as 4 months of age (**I**, arrowheads) and increases with age (arrowheads in **K** and **O**). **L** and **M**: Acinar-to-ductal metaplasia lesions are also focally observed. The boxed area in **L** is shown at higher magnification in **M**. Scale bars: 100 μ m.

expression analysis by qPCR confirmed the marked down-regulation of these key mature β -cell markers in *Gata6*-deficient islets (Fig. 5A). However, the expression of other islet hormone genes, such as glucagon and somatostatin, was not decreased in *Gata6* KO islets (Fig. 5A). Of note, levels of *Gata4* transcripts were similar between *Gata6*-deficient and control islets (Fig. 5A).

To determine whether these changes in gene expression in *Gata6* KO islets correlated with changes in protein accumulation, we performed immunohistochemical and immunofluorescence analyses in 2-, 4-, and 6-month-old mice. At both 2 and 4 months of age, a mild reduction in insulin and

C-peptide was observed in *Gata6*-deficient islets compared with control islets. However, plasma insulin and C-peptide levels were normal in fasted 2-month-old *Gata6* KO mice (Supplementary Figs. 6 and 7). Moreover, no apparent decrease in the accumulation of other β -cell markers, such as Pdx1, Glut2, Nkx2.2, and Nkx6.1, was observed in *Gata6* KO islets compared with control islets (Supplementary Fig. 6). At 6 months of age, Pdx1, Glut2, Nkx2.2, Nkx6.1, and MafA levels were markedly diminished in *Gata6* KO islets compared with control islets (Fig. 5B–J). In addition, islets lacking GATA6 displayed a notable reduction in C-peptide (Fig. 5J and K). Circulating levels of insulin and C-peptide

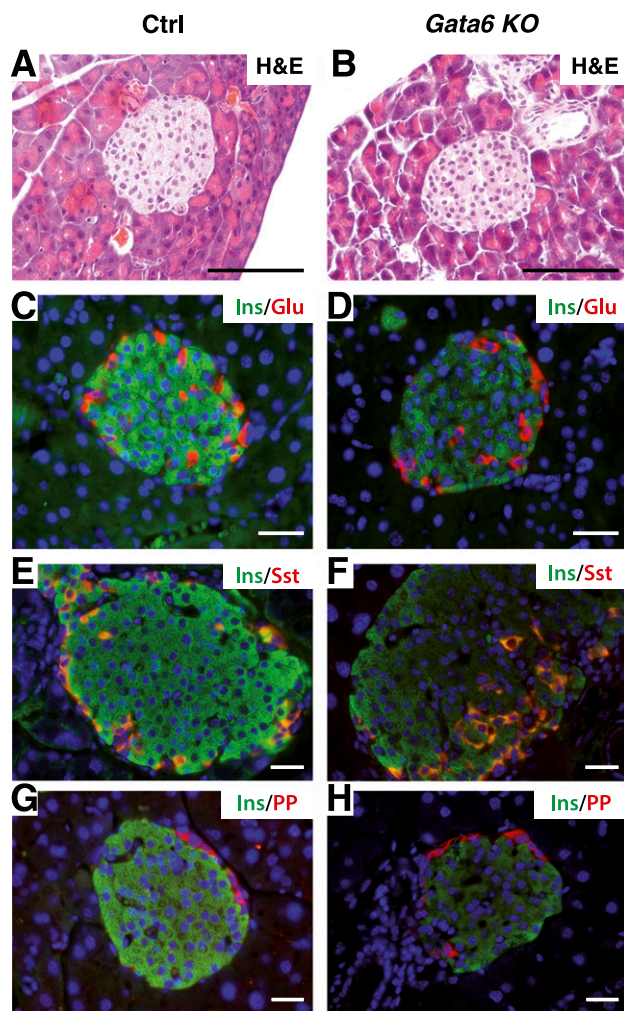


Figure 2—Islets from *Gata6* KO (G6KO) mice display normal architecture. G6KO pancreata display normal islet architecture and distribution of endocrine cells compared with control (Ctrl) pancreata at 6 months of age, as shown by histological analysis (A and B) and immunofluorescence analysis using insulin, glucagon, somatostatin (Sst), and pancreatic polypeptide (PP) (C–H). H&E, hematoxylin and eosin. C–H: Insulin immunoreactivity is markedly decreased in G6KO islets compared with Ctrl islets. Scale bars: 25 μ m.

were also decreased in *Gata6* KO mice (Supplementary Fig. 7). Thus, *Gata6* inactivation significantly affects the expression of critical β -cell-specific genes.

We next determined whether *Gata6* depletion in adult β -cells affected β -cell gene expression. To this end, we inactivated *Gata6* in isolated islets from 2-month-old *Gata6*^{flox/flox} mice by infection with adenovirus expressing Cre. Although an efficient *Gata6* inactivation was achieved, the expression of key β -cell genes was unaffected in *Gata6*-depleted islets, in contrast to what it was observed in *GATA6* KO mice of the same age (Fig. 2 and Supplementary Fig. 6).

***Gata6*-Deficient β -Cells Exhibit Increased Immature Insulin Granules, Swollen Mitochondria, and Disorganized Endoplasmic Reticulum**

To further explore the role of GATA6 in β -cell function we used the Ingenuity Pathway Analysis software to identify

pathways affected by *Gata6* inactivation. Consistent with our previous results, pathways related to insulin and β -cell function, such as “maturity-onset diabetes of the young signaling” and “insulin receptor signaling,” were found among the top canonical pathways (Fig. 6A). Other pathways identified were related to translational control and, interestingly, mitochondrial dysfunction (Fig. 6A). Indeed, several genes involved in mitochondrial function, including respiratory chain components (i.e., *Cox6a2*, *Cyp4f39*) and mitochondrial transporters (i.e., *Slc25a12*, *Slc25a22*), were downregulated in *Gata6* KO islets (Supplementary Table 1). Because a link between mitochondrial dysfunction and defective β -cell function has been proposed (25,26), we used TEM to perform ultrastructural analysis of 6-month-old *Gata6* KO and control β -cells. Mitochondria of *Gata6* KO β -cells appeared swollen, with disorganized inner-membrane cristae (Fig. 6C and E), in contrast to the dense and organized cristae of mitochondria in control β -cells (Fig. 6B and D). TEM analysis revealed additional ultrastructural abnormalities in *Gata6*-deficient β -cells compared with control mice (Fig. 6F and G). Thus, extension of the endoplasmic reticulum (ER) was observed in *Gata6* KO β -cells, indicative of ER stress (Fig. 6G). An association among mitochondrial dysfunction, ER stress, and induction of iNOS has been reported (27,28). Consistent with this notion, we observed a marked increase in iNOS expression in *Gata6* KO islets as assessed by immunofluorescence and qPCR analysis (Fig. 7). TEM analysis also showed a marked reduction in the total number of insulin granules in *Gata6*-deficient β -cells compared with control cells (Fig. 6B–K). The secretory insulin granules from control β -cells featured an electron-dense core and a translucent halo appearance, indicative of mature secretory granules (Fig. 6B, D, F, and H). However, *Gata6* KO β -cells displayed a decreased number of dense granules and a prominent number of gray low-dense granules (Fig. 6C, E, G, I, and J), indicating an increase in immature insulin granules. Despite the increase of immature secretory granules, no differences in the ratio of proinsulin to insulin circulating levels were found between *Gata6* KO and control mice (Supplementary Fig. 7). Altogether, our results indicate that GATA6 is necessary to preserve the integrity of the ER and mitochondria and the formation of insulin secretory vesicles in β -cells.

GATA6 Directly Regulates *Pdx1* Expression in Adult Islets

We previously showed that GATA factors directly regulate *Pdx1* expression in the pancreas during embryonic stages by binding to two deeply conserved GATA sites in area III of *Pdx1* regulatory sequences (1). We decided to determine whether the GATA sites in area III also contribute to *Pdx1* expression in adult islets by analyzing *Pdx1*-wt-*lacZ* mice, transgenic mice that harbor the *cis*-regulatory region of *Pdx1*-containing areas I, II, and III fused to the *lacZ* reporter gene. This transgenic construct faithfully recapitulated the endogenous expression of *Pdx1* in adult islets in three independent *Pdx1*-wt-*lacZ* transgenic lines. Thus,

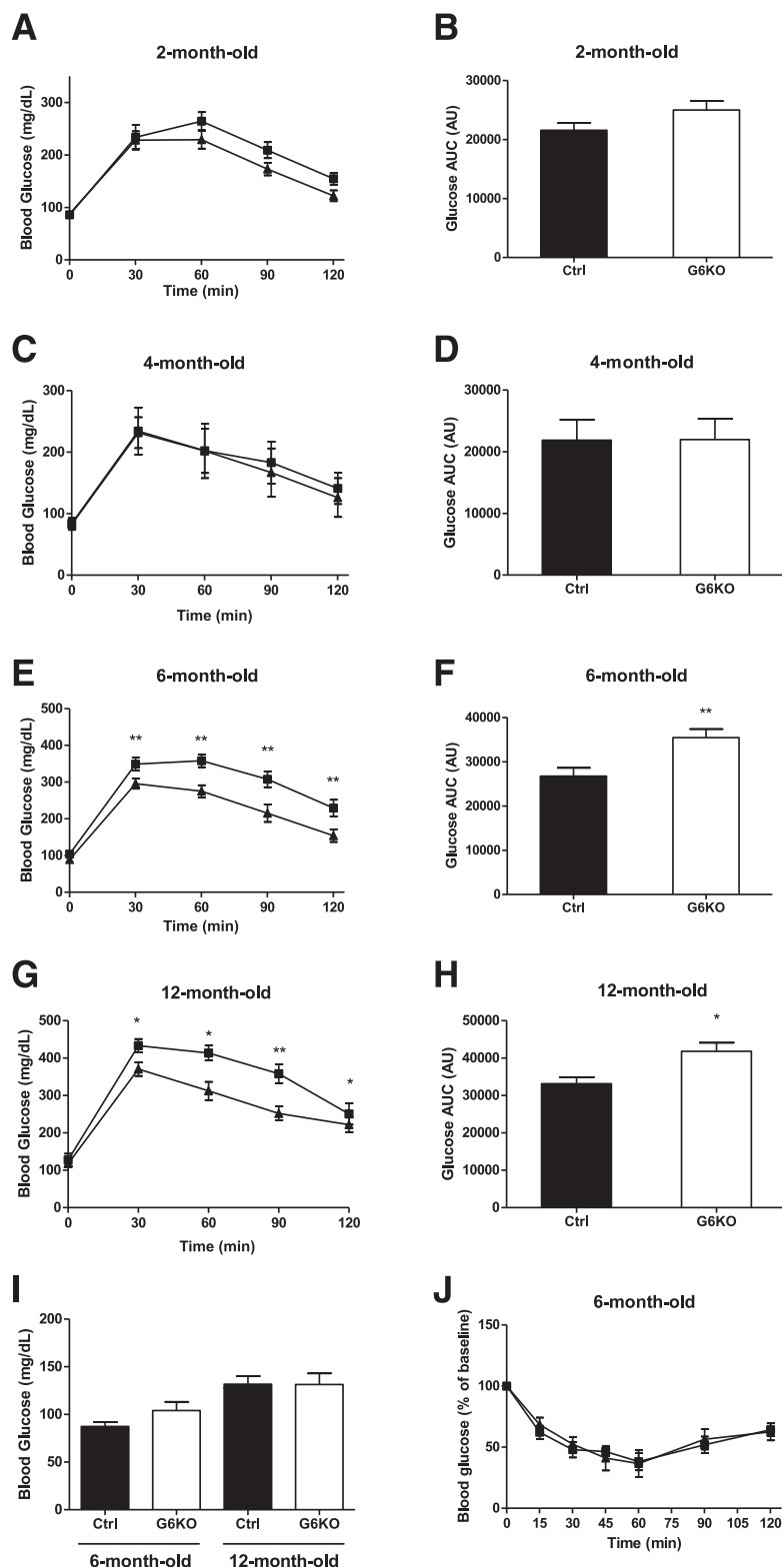


Figure 3—*Gata6* KO (G6KO) mice develop glucose intolerance. A–H: Intraperitoneal glucose tolerance tests in G6KO (■) and control (Ctrl; ▲) mice. Blood glucose concentration at baseline and at 30, 60, 90, and 120 min after glucose administration in control and G6KO mice at 2 (A), 4 (C), 6 (E), and 12 months of age (G) are shown ($n \geq 18$ male mice for each genotype). Glucose total area under the curve (AUC) in arbitrary units (AU) is similar between Ctrl and G6KO mice at 2 and 4 months of age (B and D) but significantly increased in G6KO mice compared with Ctrl mice at 6 and 12 months of age (F and H). I: Basal glucose levels under fasting conditions are similar in Ctrl and G6KO mice at 6 and 12 months of age. J: Intraperitoneal insulin tolerance tests do not reveal differences between G6KO mice and Ctrl mice at 6 months of age ($n = 6$ mice for each genotype). Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

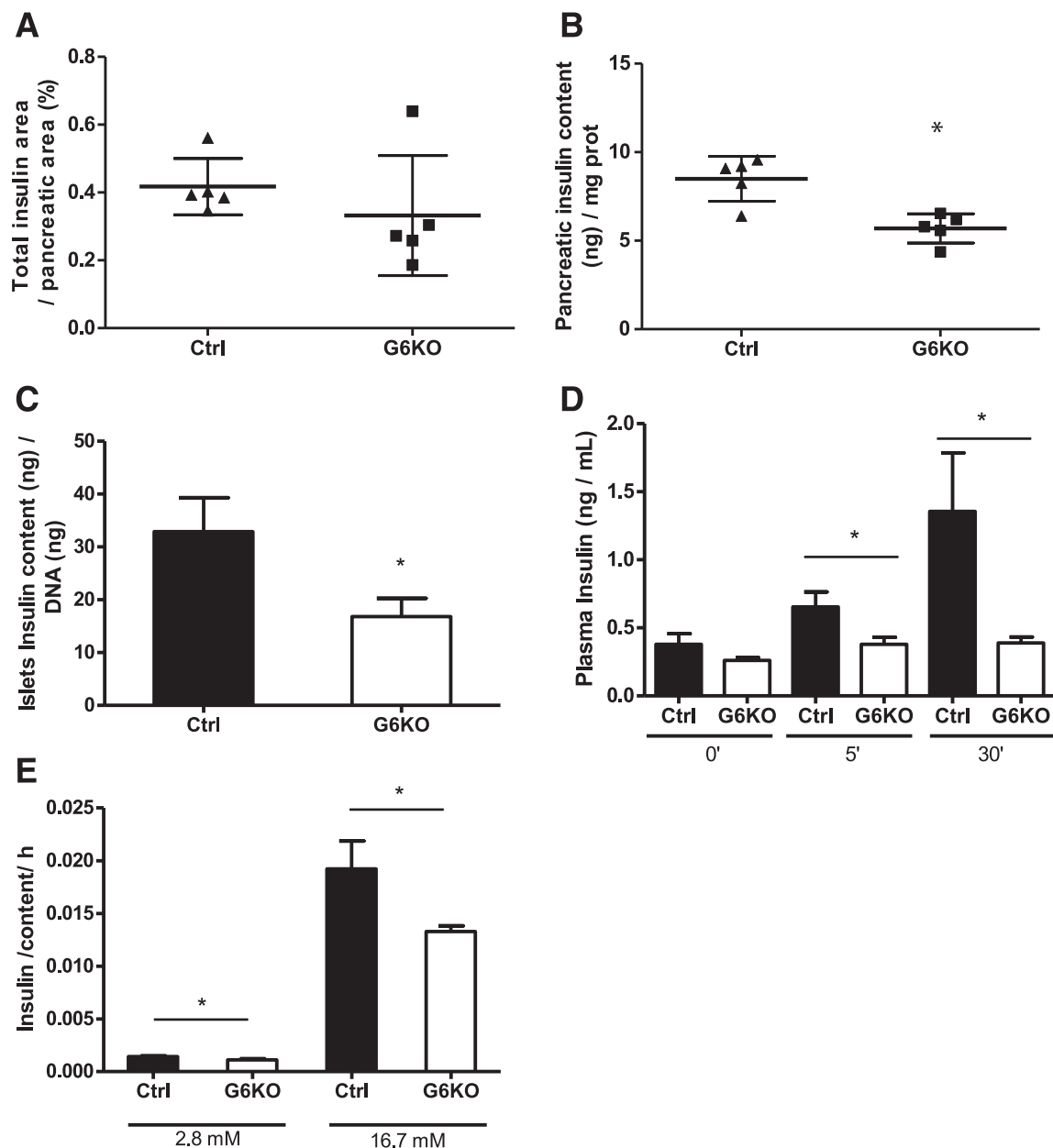


Figure 4—Decreased insulin content and insulin secretion in response to glucose in *Gata6* KO (G6KO) mice. **A:** β -Cell area is represented as the ratio of the area of insulin-positive cells per total pancreatic area using ImageJ software. No differences in β -cell area between 6-month-old control (Ctrl) and G6KO mice are observed ($n = 5$ mice each genotype). **B:** Whole pancreatic insulin content in G6KO mice is decreased compared with Ctrl mice at 6 months of age ($n = 5$ mice each genotype). **C:** Isolated G6KO islets ($n = 13$ mice) show a significant reduction in insulin content compared with Ctrl islets ($n = 14$ mice). **D:** Plasma insulin levels at baseline and after 5 and 30 min of intraperitoneal glucose load is significantly lower in G6KO mice than in Ctrl mice at 6 months of age ($n = 10$ mice each genotype). **E:** In vitro insulin secretion assay on isolated islets of 6-month-old Ctrl and G6KO mice demonstrates that G6KO islets secrete less of their total insulin content than the Ctrl islets at baseline and under high-glucose concentrations (16.7 mmol/L) ($n = 10$ mice each genotype). Data in **A** and **B** are expressed as mean \pm SD and in **C–E** as mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

β -galactosidase localization directed by *Pdx1-wt-lacZ* completely overlapped with PDX1 accumulation in pancreatic islets (Fig. 8A–D and I–L). A similar pattern of β -galactosidase expression was observed in islets of transgenic mice containing mutations in *Pdx1*-area III GATA sites at 11 weeks of age in two independent transgenic lines analyzed (Fig. 8E–H). However, mutations in *Pdx1*-area III GATA

sites resulted in a dramatic decrease of β -galactosidase expression in 6-month-old mice, with only a few β -galactosidase-positive cells found in the *Pdx1* expression domain (Fig. 8M–P). These results indicate that GATA factors directly regulate *Pdx1* expression in adult islets through GATA sites present in area III of the *Pdx1*-cis-regulatory region.

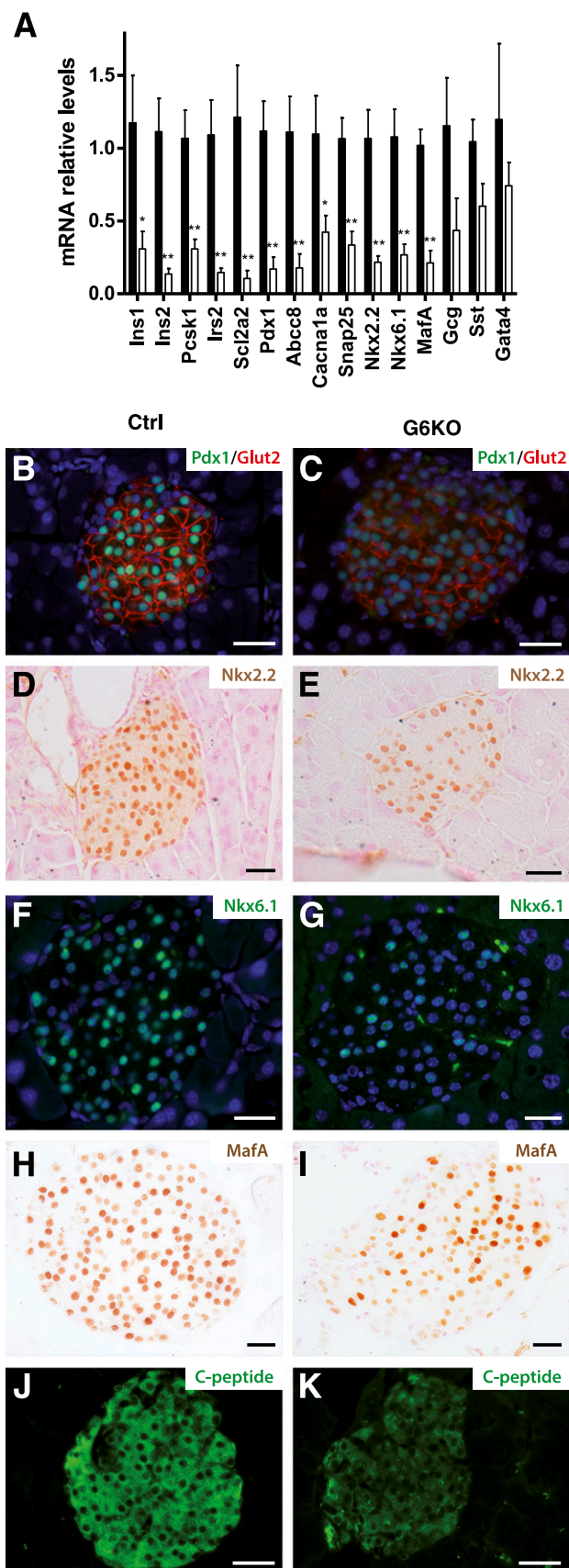


Figure 5—Changes in β -cell gene expression in *Gata6*-deficient islets. A: qPCR from total RNA of pooled of isolated islets. Transcripts levels of key genes involved in insulin synthesis and secretion are

DISCUSSION

Previous studies have shown that GATA4 and GATA6 play essential, albeit redundant, roles during embryonic pancreas development (1,2). Here we show that conditional inactivation of *Gata6* in the pancreas results in compromised glucose tolerance, mainly due to defects in insulin production and secretion.

Gata6-deficient mice showed a significant reduction in β -cell insulin content, including decreased insulin transcription. Impaired formation of insulin secretory vesicles could also contribute to the reduced insulin secretion of *Gata6*-deficient islets. TEM analysis showed that β -cells lacking GATA6 displayed decreased insulin granules but, more interestingly, increased immature insulin secretory vesicles. Increased immature insulin secretory vesicles can be associated to defective insulin processing. However, we failed to observe significant changes in the ratio of proinsulin to insulin blood levels in *Gata6* KO mice. Consistent with the defective insulin secretion phenotype, a decrease in the expression of SNAP-25, a *t*-SNARE protein that participates in the exocytosis of secretory granules (29), was observed in *Gata6*-deficient islets. *Gata6*-deficient islets also displayed reduced expression levels of *Slc2a2* and *Abcc8* that encode GLUT2 and SUR1, respectively, two key proteins critical for glucose-stimulated insulin secretion (30,31). However, although basal insulin secretion was diminished, stimulation of secretion by glucose appeared to be unaffected by *Gata6* inactivation. In agreement with this, the intracellular calcium response to glucose was not affected in *Gata6*-deficient β -cells, indicating that GLUT2 and SUR1 expression was not reduced to levels low enough to affect glucose-induced insulin secretion.

Gata6 inactivation results in decreased expression of β -cell-enriched transcription factors, including *Pdx1*, *Nkx6.1*, and *MafA*, which are essential for insulin transcription and secretion (23,32,33). Thus, we cannot rule out that the effects of GATA6 activity on β -cell function could be indirect. We previously demonstrated that GATA6 directly regulates *Pdx1* expression during early pancreatic development through GATA sites present in area III of the *Pdx1* regulatory sequence (1). We now show that, interestingly, these GATA sites are also required for *Pdx1* expression in adult β -cells. Altogether, our data reveal GATA6 as a key component of the transcriptional network regulating β -cell function.

dramatically decreased in *Gata6* KO (G6KO) islets compared with control (Ctrl) islets. No significant changes are observed in glucagon, somatostatin, and *Gata4* transcripts. Ctrl mice: ■; G6KO mice: □. Gene expression data are normalized to β -actin mRNA levels and presented as mean \pm SEM ($n = 7$ pools of isolated islets for each group; each pool contains islets from three mice). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. B–K: Immunofluorescence analysis confirms the reduced accumulation of Pdx1, Glut2, Nkx2.2, Nkx6.1, MafA, and C-peptide proteins in G6KO islets compared with Ctrl islets. Scale bars: 25 μ m.

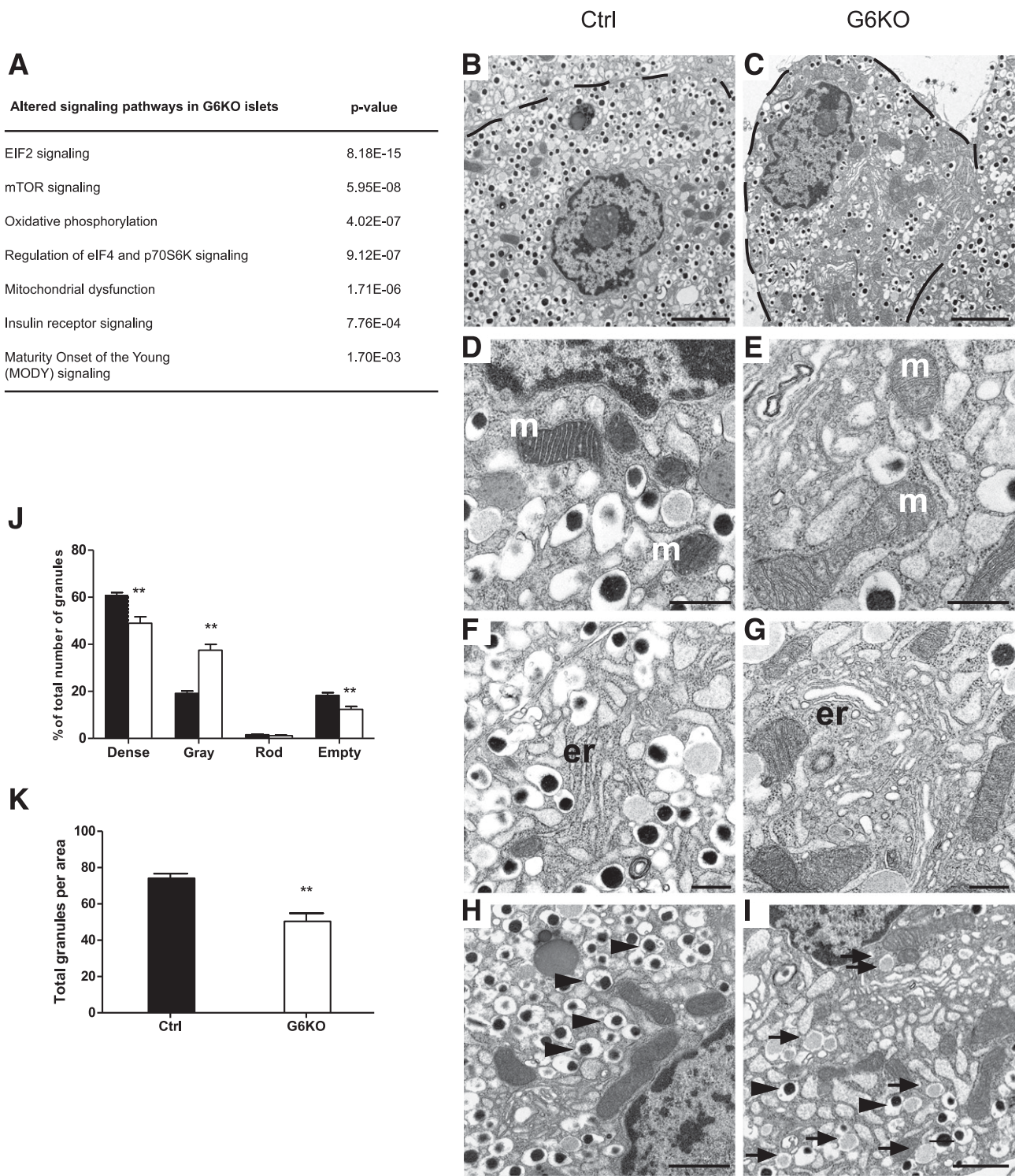


Figure 6—Ultrastructure analyses of *Gata6*-deficient islets. **A**: Ingenuity Pathway Analysis from microarray data reveals altered signaling pathways in *Gata6*-deficient islets. Representative images of TEM of control (Ctrl) (**B**, **D**, **F**, and **H**) and *Gata6* KO (G6KO) (**C**, **E**, **G**, and **I**) β-cells from 6-month-old mice are shown. Lower magnification of TEM images of Ctrl (**B**) and G6KO β-cells (**C**). The mitochondria (**m**) of β-cells from G6KO mice are severely swollen with disordered cristae (**E**) compared with normal mitochondrial morphology in Ctrl β-cells (**D**). The endoplasmic reticulum (**er**) cisternae of β-cells lacking GATA6 appeared distended and extremely disorganized (**G**) compared with Ctrl β-cells (**F**). Dense core insulin granules (arrowheads) are reduced in G6KO β-cells (**I**) compared with Ctrl β-cells (**H**). Immature secretory granules are prominent in *Gata6*-deficient β-cells (arrows) (**I**). **J**: Quantification of insulin secretory granules according to the core; dense, gray, rod-shaped, or empty (Ctrl β-cells: ■; G6KO β-cells: □). **K**: Total insulin secretory granules are decreased in G6KO β-cells compared with Ctrl β-cells. Scale bars: 2 μm in **B** and **C**, 500 nm in **D**–**G**, and 1 μm in **H** and **I**.

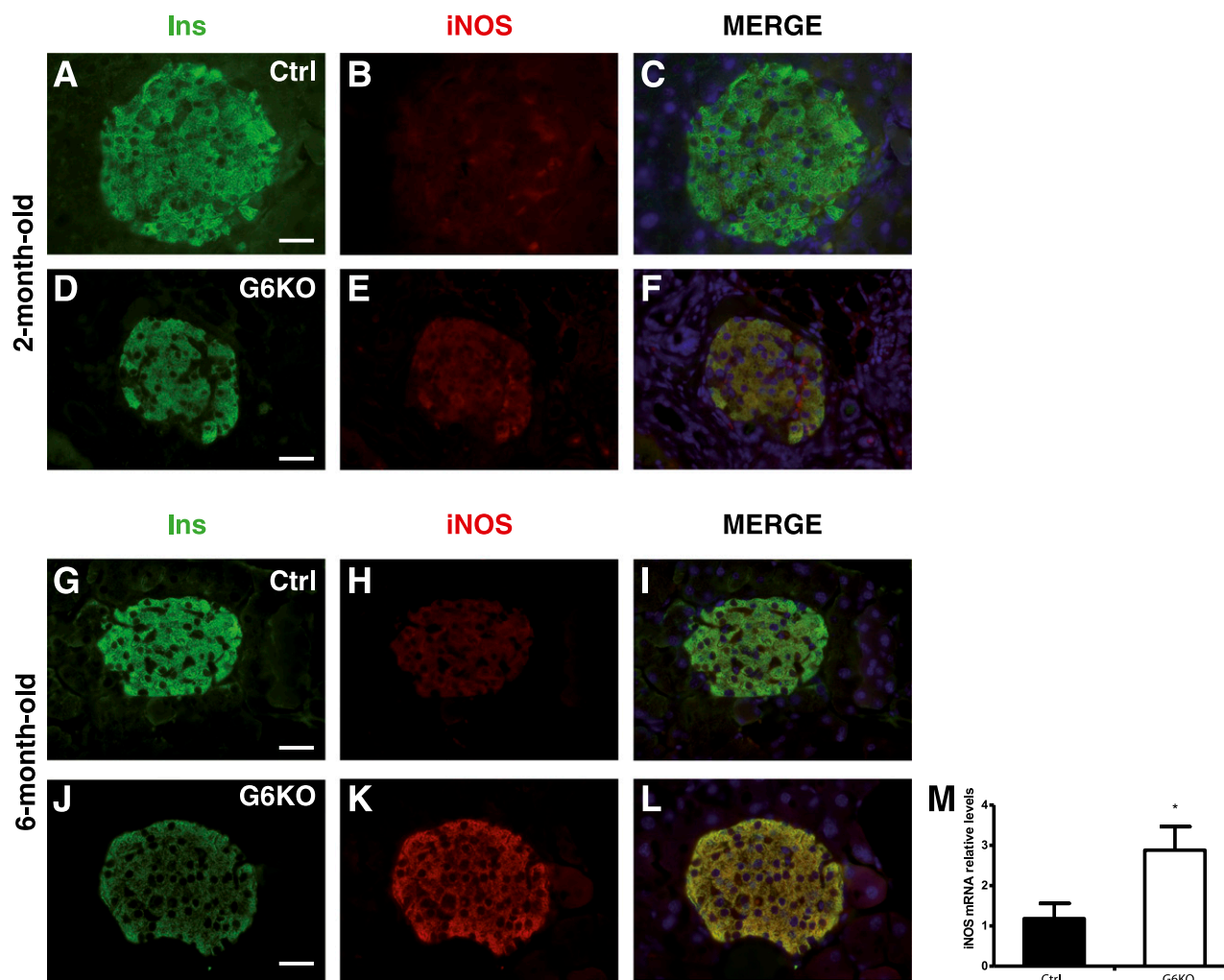


Figure 7—Accumulation of iNOS in *Gata6*-deficient β -cells. Immunofluorescence analysis of iNOS in islets of control (Ctrl) and *Gata6* KO (G6KO) mice at 2 months (A–F) and 6 months (G–L) of age. Scale bars: 25 μ m. M: qPCR of *iNOS* expression in islets of Ctrl and G6KO mice at 6 month of age ($n = 10$ mice). Data are expressed as mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

Despite multiple defects in insulin transcription, biosynthesis, and secretion, *Gata6* KO mice do not become overtly hyperglycemic. We did not observe any compensatory increase in β -cell area or insulin sensitivity that could explain the lack of hyperglycemia, but we cannot rule out other compensatory mechanisms such as neural regulation or incretin hormone secretion. Interestingly, inactivation of other β -cell transcription factors, such as *Rfx6* and *NeuroD*, also results in β -cell dysfunction and glucose intolerance without developing overt hyperglycemia (34,35).

Our microarray analysis revealed a marked aspect of the gene expression profile of *Gata6* KO islets, the impairment of mitochondrial gene expression. In agreement with these results, TEM analysis revealed swelling of mitochondria, exhibiting disrupted cristae in *Gata6*-deficient β -cells. Similar mitochondrial alterations have been associated to β -cell failure, as reviewed by Supale et al. (25). Thus, mitochondrial dysfunction might also underlie the impairment of β -cell function in *Gata6* KO mice. ER abnormalities were

also observed in *Gata6*-deficient β -cells in concordance with the increasing body of evidence suggesting that mitochondrial and ER function are interconnected in β -cells (36). Interestingly, a marked increase in iNOS expression was found in *Gata6* KO islets, a protein associated with mitochondrial dysfunction and ER stress (iNOS) has been reported (27,28). The mTOR signaling may also play a role in the interplay between mitochondrial and ER function according to recent reports (37,38). Interestingly, Ingenuity Pathway analysis predicted activation of the mTOR signaling pathway in *Gata6* KO islets. Further studies will be required to clarify the direct role of GATA6 in the regulation of these pathways in β -cells.

Our results are in apparent contradiction with two reports describing inactivation of *Gata6* in mouse β -cells. The inactivation of *Gata6* using a *Ptf1a*-Cre line did not have any effect in glucose homeostasis in 30-week-old mice (20). Similarly to the *Gata6*^{fllox/fllox}; *Pdx1*-Cre mice used in this study, the inactivation of *Gata6* in *Gata6*^{fllox/fllox}; *Ptf1a*-Cre

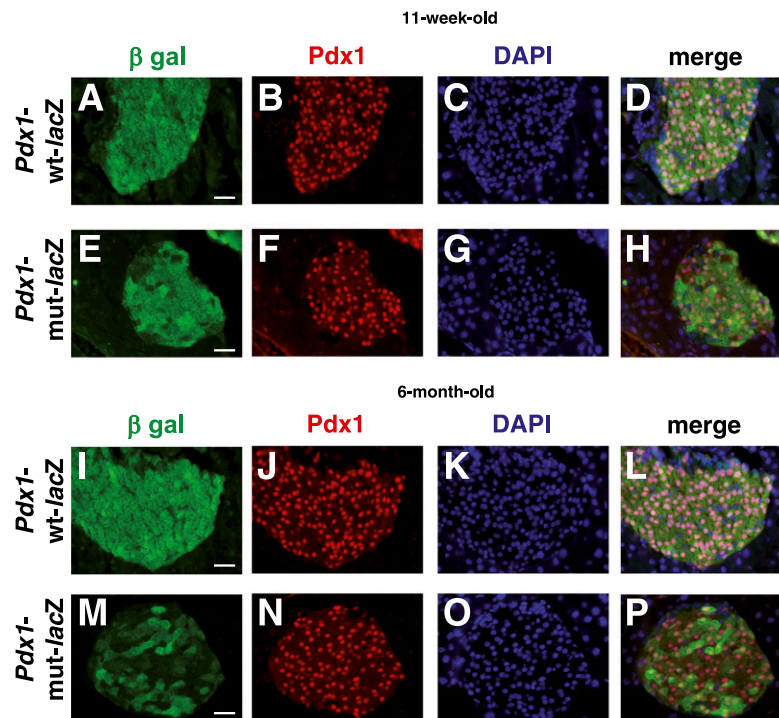


Figure 8—Conserved GATA sites in area III are required for *Pdx1* expression in adult islets. Immunofluorescence analysis on pancreatic sections of 2- (A–H) and 6-month-old (I–P) *Pdx1*-wt-*lacZ* mice reveals a complete overlapping expression of β -galactosidase and endogenous *Pdx1* expression. E–H: β -Galactosidase expression in islets of *Pdx1*-mut-*lacZ* mice closely mirrors the *Pdx1* endogenous expression in 2-month-old mice. M–P: By contrast, only a few *Pdx1*-positive cells express β -galactosidase in the islets of *Pdx1*-mut-*lacZ* mice at 6 months of age. Scale bars: 25 μ m.

mice also occurred early in pancreatic progenitors but at slightly different times (39). A possible explanation to the discrepancy in the glucose tolerance phenotype between these mouse models is that GATA6 might be required for the proper maturation and function of adult β -cells during a specific developmental time window in which *Pdx1*, but not *Ptf1a*, is expressed. Differences in Cre recombinase efficiency in endocrine cells of the two mouse models might also contribute to the observed discrepancies (40).

In other study, the inactivation of *Gata6* specifically in adult β -cells (using the *Ins2-Cre^{ERT}* mouse strain) did not affect glucose homeostasis (41). However, the authors report inefficient *Gata6* deletion that could explain the lack of metabolic phenotypes on their mice. In contrast, we observed substantial *Gata6* inactivation using the *Pdx1-Cre* line. An alternative possibility is that *Pdx1-Cre*-mediated *Gata6* inactivation during embryonic stages causes the observed defects later in adult β -cells. In this regard, we performed in vitro *Gata6* depletion in adult mouse islets without any apparent effect on β -cell gene expression. Although these experiments are far from conclusive regarding a possible developmental origin of *Gata6* KO defects, they suggest the *Gata6* inactivation does not have an immediate effect on β -cell function. Interestingly, despite the early inactivation of *Gata6* by using the *Pdx1-Cre* line, *Gata6* KO mice do not become clearly glucose intolerant until 6 months of age. The progressive defect in glucose homeostasis

is not uncommon in mouse models of β -cell dysfunction and might be due to increased metabolic stress associated to age and concomitant increase in body weight. However, 6-month-old *Gata6* KO mice develop exocrine defects that could potentially affect islet function. Although we cannot formally rule out this effect, we consider this an unlikely possibility based on the following observations. First, compromised expression of β -cell genes is found in 2-month-old mice, before overt exocrine defects are observed. Second, plasma amylase levels in 2- and 6-month-old *Gata6* KO mice are not increased, indicating the functional effect of pancreatic injury was minor. Finally, 30-week-old *Gata6^{flox/flox};Ptf1a-Cre* mice display extensive pancreatic exocrine abnormalities but no defects in glucose homeostasis.

Recent genetic studies have revealed that GATA6 mutations can cause adolescent/adult-onset diabetes with subclinical or no exocrine insufficiency. Unfortunately, little is known about deficits in β -cell function in this specific group of patients. However, two recent studies using in vitro-directed differentiation of β -like cells from human pluripotent stem cells indicate a critical role for GATA6 in β -cell function (7,8). GATA6 mutant β -like cells display impaired insulin secretion and downregulation of key genes involved in β -cell function. Our results are in agreement with these reports demonstrating that GATA6 activity is necessary for β -cell function in mice. The elucidation of the mechanisms underlying diabetes onset on patients with GATA6

mutations will shed light on the differential requirements of GATA6 for pancreas development versus adult β -cell function.

In summary, our results show that loss of *Gata6* markedly decreases the expression of insulin, key components of insulin synthesis and secretion machinery, and β -cell-enriched transcription factors, demonstrating an essential role for GATA6 in β -cell function.

Acknowledgments. The authors thank Antonio Cárdenas and Alberto Morante, from Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), for their technical assistance. The authors also thank Juan Luis Ribas, from the University of Seville, for the electronic microscopy technical services, and Eloisa Andújar and Mónica Pérez, from the Genomic Unit of CABIMER. The authors thank the Andalusian Bioinformatics Platform at the University of Malaga (www.scbi.uma.es) for providing access to Ingenuity Pathway Analysis software.

Funding. L.V. was supported by a contract from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (RYC-2013-14533). E.R.-S. was supported by a “Juan de la Cierva” postdoctoral fellowship from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (JCI-2014-19251). This work was supported by grants from ISCIII cofunded by Fondos FEDER (PI14/01015, RD/0019/0028, and RD16/0011/0034 to B.S. and PI14/0804 to A.R.) and “Ramón y Cajal” program from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PI14/0804, RYC-2013-14533 to A.R.). P.M. was supported by a Juan de la Cierva fellowship from Spanish Ministry of Science and Innovation and by a Stand-Alone Grant from the Austrian Science Fund (FWF P27361-B23). Work by I.Q. was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2016-77125-R). Work by D.A.C. was supported by the Nicolás Monardes program of Andalusian Ministry of Health (C-0015-2014) and the Andalusian Ministry of Science and Innovation (CTS-7478).

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. L.V., E.R.-S., R.A., M.C., E.B.-T., and J.M.M.-G. performed the experiments. B.R.G., P.M., I.Q., B.S., F.M., D.A.C., and A.R. conceived the data. I.Q., D.A.C., and A.R. analyzed the data. D.A.C. and A.R. wrote the manuscript. All authors edited the manuscript. A.R. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Carrasco M, Delgado I, Soria B, Martín F, Rojas A. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest* 2012;122:3504–3515
- Xuan S, Borok MJ, Decker KJ, et al. Pancreas-specific deletion of mouse *Gata4* and *Gata6* causes pancreatic agenesis. *J Clin Invest* 2012;122:3516–3528
- Allen HL, Flanagan SE, Shaw-Smith C, et al. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet* 2011;44:20–22
- De Franco E, Shaw-Smith C, Flanagan SE, et al. GATA6 mutations cause a broad phenotypic spectrum of diabetes from pancreatic agenesis to adult-onset diabetes without exocrine insufficiency. *Diabetes* 2013;62:993–997
- D'Amato E, Giacomelli F, Giannattasio A, et al. Genetic investigation in an Italian child with an unusual association of atrial septal defect, attributable to a new familial GATA4 gene mutation, and neonatal diabetes due to pancreatic agenesis. *Diabet Med* 2010;27:1195–1200
- Shaw-Smith C, De Franco E, Lango Allen H, et al. GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes. *Diabetes* 2014;63:2888–2894
- Tiyaboonchai A, Cardenas-Diaz FL, Ying L, et al. GATA6 plays an important role in the induction of human definitive endoderm, development of the pancreas, and functionality of pancreatic β cells. *Stem Cell Reports* 2017;8:589–604
- Shi ZD, Lee K, Yang D, et al. Genome editing in hPSCs reveals GATA6 haploinsufficiency and a genetic interaction with GATA4 in human pancreatic development. *Cell Stem Cell* 2017;20:675–688.e6
- Lorberbaum DS, Sussel L. Gata have GATA for human pancreas development. *Cell Stem Cell* 2017;20:577–579
- Sodhi CP, Li J, Duncan SA. Generation of mice harbouring a conditional loss-of-function allele of *Gata6*. *BMC Dev Biol* 2006;6:19
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–450
- Rojas A, Kong SW, Agarwal P, Gilliss B, Pu WT, Black BL. GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and Cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium. *Mol Cell Biol* 2008;28:5420–5431
- Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1969;26:31–43
- Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, et al. Beta cell-specific *Znt8* deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia* 2010;53:1656–1668
- Tong X, Kono T, Anderson-Baucum EK, et al. SERCA2 deficiency impairs pancreatic β -cell function in response to diet-induced obesity. *Diabetes* 2016;65:3039–3052
- Gonzalez A, Merino B, Marroquí L, et al. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual β -cells. *Endocrinology* 2013;154:3515–3524
- Puri S, Cano DA, Hebrok M. A role for von Hippel-Lindau protein in pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 2009;58:433–441
- Muñoz-Bravo JL, Hidalgo-Figueroa M, Pascual A, López-Barneo J, Leal-Cerro A, Cano DA. GDNF is required for neural colonization of the pancreas. *Development* 2013;140:3669–3679
- Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D991–D995
- Martinelli P, Cañamero M, del Pozo N, Madriles F, Zapata A, Real FX. Gata6 is required for complete acinar differentiation and maintenance of the exocrine pancreas in adult mice. *Gut* 2013;62:1481–1488
- Cissell MA, Zhao L, Sussel L, Henderson E, Stein R. Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by *Nkx2.2*. *J Biol Chem* 2003;278:751–756
- Taylor BL, Liu FF, Sander M. *Nkx6.1* is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep* 2013;4:1262–1275
- Iype T, Francis J, Garney JC, et al. Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor *Pdx-1*: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes. *J Biol Chem* 2005;280:16798–16807
- Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, et al. *MafA* is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 2005;25:4969–4976
- Supale S, Li N, Brun T, Maechler P. Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:477–487
- Lu H, Koshkin V, Allister EM, Gyulkhandanyan AV, Wheeler MB. Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with beta-cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2010;59:448–459
- Jeon MJ, Leem J, Ko MS, et al. Mitochondrial dysfunction and activation of iNOS are responsible for the palmitate-induced decrease in adiponectin synthesis in 3T3L1 adipocytes. *Exp Mol Med* 2012;44:562–570
- Lee JW, Kim WH, Yeo J, Jung MH. ER stress is implicated in mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of pancreatic beta cells. *Mol Cells* 2010;30:545–549
- Jeans AF, Oliver PL, Johnson R, et al. A dominant mutation in *Snap25* causes impaired vesicle trafficking, sensorimotor gating, and ataxia in the blind-drunk mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2431–2436
- Guillam MT, Dupraz P, Thorens B. Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 2000;49:1485–1491
- Seghers V, Nakazaki M, DeMayo F, Aguilar-Bryan L, Bryan J. *Sur1* knockout mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 2000;275:9270–9277

32. Kataoka K, Han SI, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 2002;277:49903–49910
33. Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M, Stein R. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2930–2933
34. Piccand J, Strasser P, Hodson DJ, et al. Rfx6 maintains the functional identity of adult pancreatic β cells. *Cell Rep* 2014;9:2219–2232
35. Gu C, Stein GH, Pan N, et al. Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab* 2010;11:298–310
36. Malhotra JD, Kaufman RJ. ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004424
37. Kim-Muller JY, Fan J, Kim YJ, et al. Aldehyde dehydrogenase 1a3 defines a subset of failing pancreatic β cells in diabetic mice. *Nat Commun* 2016;7:12631
38. Chau GC, Im DU, Kang TM, et al. mTOR controls ChREBP transcriptional activity and pancreatic β cell survival under diabetic stress. *J Cell Biol* 2017;216:2091–2105
39. Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CV, Magnuson MA. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol* 2008;316:74–86
40. Puri S, García-Núñez A, Hebrok M, Cano DA. Elimination of von Hippel-Lindau function perturbs pancreas endocrine homeostasis in mice. *PLoS One* 2013;8:e72213
41. Sartori DJ, Wilbur CJ, Long SY, et al. GATA factors promote ER integrity and β -cell survival and contribute to type 1 diabetes risk. *Mol Endocrinol* 2014;28:28–39



CRITICAL REVIEW

GATA factors in pancreas development and disease

Laura Villamayor¹ | David A. Cano² | Anabel Rojas^{1,3}

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa-CABIMER, Universidad Pablo de Olavide, Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Seville, Spain

²Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain

Correspondence

Anabel Rojas, PhD, Avda. Américo Vespucio s/n. Parque Científico Isla de la Cartuja, Sevilla 41092, Spain.
Email: anabel.rojas@cabimer.es

Funding information

Andalusian Ministry of Science and Innovation, Grant/Award Number: CTS-7478; ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación co-funded with Fondos FEDER, Grant/Award Number: PI16/00175; Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Grant/Award Numbers: BFU2017-82497-P, RYC-2013-14533

Abstract

There is an urgent need for the development of novel therapeutics options for diabetic patients given the high prevalence of diabetes worldwide and that, currently, there is no cure for this disease. The transplantation of pancreatic islets that contain insulin-producing cells is a promising therapeutic alternative, particularly for type 1 diabetes. However, the shortage of organ donors constitutes a major limitation for this approach; thus, developing alternative sources of insulin-producing cells is of critical importance. In the last decade, our knowledge of the molecular mechanisms controlling embryonic pancreas development has significantly advanced. More importantly, this knowledge has provided the basis for the in vitro generation of insulin-producing cells from stem cells. Recent studies have revealed that GATA transcription factors are involved in various stages of pancreas formation and in the adult β cell function. Here, we review the fundamental role of GATA transcription factors in pancreas morphogenesis and their association with congenital diseases associated with pancreas.

KEYWORDS

β cell, cellular glucose metabolism, diabetes, pancreatic islet cells, pancreatic transcription factors

1 | INTRODUCTION TO PANCREAS DEVELOPMENT

The mammalian pancreas is a mixed exocrine and endocrine organ. The exocrine tissue is composed of clusters of acinar

cells that produce and secrete digestive enzymes through a network of ductal cells. The endocrine pancreas is organized in clusters of hormone-producing cells called islets of Langerhans. The islets of Langerhans are scattered throughout the exocrine compartment and produce hormones that

Abbreviations: Abcc8, ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8; BMP, Bone Morphogenetic Protein; CACNA1C, Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C; CS, Carnegie Stage; E, Embryonic stage; FGF, Fibroblast growth factor; FoxA1, Forehead box A1; FoxA2, Forehead box A2; Glut2, Glucose transporter 2; Hedgehog, Hh; Hes1, Hes Family BHLH Transcription Factor 1; hESCs, Human Embryonic Stem Cells; HNF1B, Hepatocyte Nuclear Factor 1B; HNF6, Hepatocyte Nuclear Factor 6; hPSCs, Human Pluripotent Stem Cells; Ins1, insulin gene 1; Ins2, Insulin gene 2; iPS, Induced Pluripotent Stem cell; KRas, Kirsten RAt Sarcoma; MIST-1, muscle, intestine and stomach expression 1; MPC, Multipotent Pancreatic progenitor Cell; Ngn3, Neurogenin 3; NR5A2, Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 2; PCSK1, Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1; PDX1, pancreatic and Duodenal homeobox 1; PTF1A, Pancreas Specific Transcription Factor 1A; RBPJL, Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region Like; RA, Retinoic acid; RT-PCR, Real time polymerase chain reaction; SNAP25, Synaptosome Associated Protein 25; Shh, Sonic Hedgehog; Sox9, Sex-determining region on the Y chromosome related high-mobility group (HMG) box 9; Sur1, Sulfonylurea Receptor 1; Wnt, Wingless INT-1.

regulate glucose homeostasis. The pancreatic islets contain five types of endocrine cells: glucagon-producing α cells, insulin-producing β cells, somatostatin-producing δ cells, pancreatic polypeptide-producing cells, and ghrelin-producing ϵ cells.

Due to the difficulty of obtaining human pancreatic samples at embryonic stages, our understanding of pancreas development derives mainly from mouse studies. However, morphogenesis events and key regulators of pancreas organogenesis appear to be greatly conserved between human and mouse, as recently reviewed.¹ Pancreas formation can be separated into three major stages. In the mouse, the primary transition occurs between embryonic stage (E) 8.5 and E12.5 and includes the formation of the pancreatic rudiments from the endodermal primitive gut tube and specification of the different pancreatic cell types. During the secondary

transition (E12.5–E15.5), the pancreatic epithelium undergoes extensive expansion and branching concomitant with the differentiation of acinar, ductal, and endocrine cells. The third phase of pancreas formation takes place after E15.5 with further expansion and maturation that continues postnatally (Figure 1).

In the mouse, the pancreas originates from a discrete region of the endodermal primitive gut tube forming a dorsal and a ventral evagination (bud) starting around E8.5.^{2,3} The formation of the pancreatic buds is dictated by signals from their adjacent tissues, such as the notochord, cardiac mesoderm, and aortic endothelium. Some of the extrinsic signals controlling pancreas specification have been identified and include, among others, fibroblast growth factor (FGF), bone morphogenetic protein, retinoic acid (RA), and Hedgehog.⁴ Interestingly, the dorsal pancreatic and ventral pancreatic

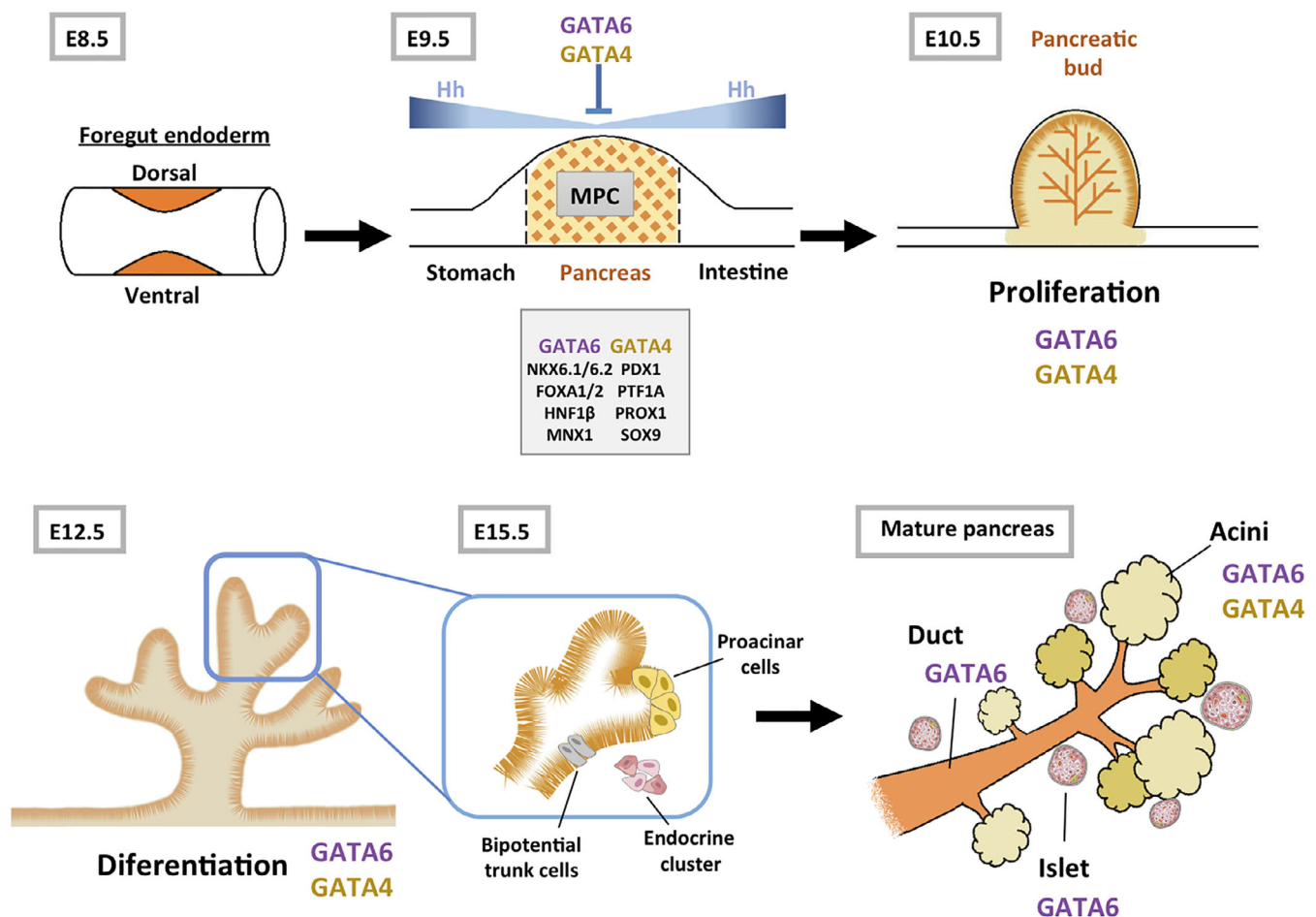


FIGURE 1 Overview of morphogenic events and key regulators of mouse pancreas development. Pancreas specification occurs at embryonic stage (E) 8.5 in discrete regions of the foregut endoderm that escape from Hedgehog (Hh) inhibitory signals. The early pancreatic epithelium is formed of multipotent pancreatic progenitor cells (MPCs) that proliferate and expand by the action of intrinsic transcription factors, including GATA4 and GATA6 (E9.5–E10.5). Between E12.5 and E15.5, the pancreatic epithelium undergoes a process of branching resulting in the formation of tip domain (proacinar) and trunk (ductal/endocrine) domains. In the mature pancreas, *Gata4* expression is largely restricted to acinar cells. GATA6 is expressed in islets of Langerhans, acinar, and ductal cells. This figure was created using Servier Medical Art templates, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://smart.servier.com>)

primordia are induced by markedly different signals. This is well illustrated by the negative role of sonic hedgehog (Shh) in regulating pancreas formation. In contrast to other endoderm-derived organs, the induction of the dorsal pancreas requires the inhibition of Shh, an event mediated by signals provided the notochord.⁵ Also, RA signaling is selectively required for the development of the dorsal pancreas.⁶ These extrinsic signals activate the expression of transcription factors specifically in the prepancreatic endoderm. Among these transcription factors, pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) and pancreas specific transcription factor 1a (PTF1A) are the earliest expressed in the pancreatic domain and are critical for the initiation of the pancreatic genetic program.^{7–11} Once the dorsal and ventral pancreatic primordia are formed, the pancreatic epithelium undergoes a marked expansion from E9.5 until E12.5 when the two buds fuse. During this period, vascularization and innervation of the pancreas are also established.^{12,13}

The early pancreatic epithelium is composed of multipotent pancreatic progenitor cells (MPCs) that have the potential to give rise to all types of pancreatic cells. The expansion of MPCs is mediated by extrinsic signals such as Wnt and FGF signaling. In addition, a substantial number of intrinsic transcription factors are involved in MPCs expansion and maintenance including PDX1, PTF1A, SOX9, FOXA1, FOXA2, GATA4, GATA6, HES1, HNF1B, and HNF6, among others (see for recent reviews^{14–17}). There is an extensive cross-regulation among these transcription factors generating a gene regulatory network that maintains multipotency of MPCs. Recent studies have reported that the same gene regulatory network controls human MPCs.¹⁸ Between E12.5 and E15.5, a period known as the secondary transition, a complex process of branching morphogenesis takes place in the pancreatic epithelium that results in the formation of tip and trunk domains that define different pancreatic cell fates.¹⁹ Thus, after E13.5, the tip domains exclusively generate acinar cells while the trunk domains give rise to endocrine and ductal cells. The segregation of pancreatic lineages is mediated by transcriptional cross-repression between PTF1A (that promotes tip identity) and NKX6.1/6.2 (that promotes trunk identity).²⁰ During the secondary transition, the master regulator of endocrine differentiation, the transcription factor neurogenin 3 (Ngn3), gets activated in individual cells of the trunk. These *Ngn3*-expressing cells differentiate into the pancreatic endocrine lineage that is forming proto-islets.²¹ The cells in the trunk domain that do not express *Ngn3* give rise to adult ductal cells. Acinar cell differentiation from tip cells is regulated in a coordinated manner by the transcription factors PTF1A, RBP-JL, and NR5A2.^{22,23} By E15.5, there is substantial growth of the pancreas, mainly through acinar cell proliferation. Also, further differentiation of endocrine and exocrine

pancreatic cells occurs, a process that continues into postnatal life (Figure 1).

2 | MUTATIONS IN GATA FACTORS AND PANCREAS ABNORMALITIES IN HUMANS

The association between mutations in GATA factors and a range of developmental anomalies in humans has been known for some time but it was only until recently that a link to pancreatic pathologies was reported. In 2011, Lango Allen et al. performed exome sequencing to identify the genetic mutation/s causing pancreatic agenesis, a rare congenital anomaly in which the pancreas is absent or extremely reduced.²⁴ They found that heterozygous *GATA6* mutations were the most common cause of this disease. The majority of *GATA6* mutations in these individuals were de novo heterozygous mutations. Subsequent work confirmed this finding and revealed a more complex picture.^{25–34} First, patients with *GATA6* mutations often present defects in other organs including the heart and gut. Second, patients with *GATA6*-inactivating mutations show a broad spectrum of pancreatic abnormalities, from complete agenesis of the pancreas to moderate diabetes developed during adulthood with or without exocrine insufficiency (that might be suggestive of some degree of acinar function defects). Indeed, it has been reported that family members harboring the same *GATA6* mutant allele can present with markedly different phenotypes.^{32–34} Finally, mutations in *GATA4* has also been more recently linked to neonatal and childhood-onset diabetes mellitus with or without exocrine insufficiency.³⁵ Altogether, these genetic studies indicate a critical role for *GATA4* and *GATA6* in normal development of the human pancreas, a notion confirmed by studies on human embryonic stem cells (hESCs) (at least for *GATA6*, see in the following).

3 | ROLE OF GATA FACTORS IN MOUSE PANCREAS FORMATION

The subfamily of GATA factors *Gata4/5/6* is expressed in the definitive endoderm that gives rise to pancreas as well as other organs of the gastrointestinal system. An exhaustive survey of GATA factors expression in the mouse pancreas by RNA in situ hybridization has shown that only *Gata4* and *Gata6* are expressed in the embryonic pancreas.³⁶ Both factors are expressed in the presumptive pancreatic endoderm and continue to be expressed throughout the pancreatic embryonic development. Although earlier studies reported contradictory *Gata* expression data during pancreas formation,^{36–39} recent immunohistochemistry studies have

clarified their expression patterns in the embryonic pancreas. Thus, *Gata4* expression becomes progressively restricted to the acinar compartment, while *Gata6* is expressed in both the endocrine and exocrine compartment in the adult pancreas.^{40–42} Mouse transgenic reporter assays have demonstrated *Gata4* and *Gata6* expression patterns in the pancreas that are similar to what it is observed in immunohistochemistry studies.^{43,44} However, a study has reported detectable (albeit low) levels of *Gata4* expression in mouse islets, as assessed by RT-PCR.⁴²

The study of GATA factors in pancreas formation has been hampered due to the early embryonic lethality of *Gata4* or *Gata6* null mice. Inactivation of *Gata4* in the germline cause embryonic lethality around E8.5 due to defects in extraembryonic endoderm.^{45,46} Similarly, *Gata6* null mice embryonic development is arrested after gastrulation stages.⁴⁷ Attempts to circumvent the early lethality of *Gata4* have been done by tetraploid complementation, in which *Gata4*^{−/−} embryos have been provided with *Gata4*^{+/+} extraembryonic endoderm. These studies showed that ventral pancreatic induction was abrogated in the absence of GATA4.⁴⁸ However, it is not clear from these studies whether GATA4 plays a cell-autonomous role in pancreas development. More recently, the use of conditional knockout approaches mediated by the Cre-loxP system has helped to define the multiple roles of GATA factors in pancreatic development.

GATA factors act as pioneer factors in initiating organ-specific gene expression during embryonic development.⁴⁹ As discussed previously, both *Gata4* and *Gata6* are expressed in the foregut endoderm and have been reported to be involved in activating liver- and intestine-specific genes, respectively, in the primitive gut tube.^{50–52} However, conditional inactivation of *Gata4* and *Gata6* in the prepancreatic endoderm using the *Foxa3-Cre* driver did not block pancreas specification nor initial pancreas budding.⁵³ Thus, GATA4 and GATA6 factors do not seem to be required for pancreas specification in mice. Interestingly, GATA5 transcription factor has been described to be involved in pancreas specification in zebrafish and *Xenopus*.^{54,55} However, *Gata5* does not seem to be expressed in the mouse embryonic pancreas.³⁶ Thus, it is unlikely that GATA5 may be required for pancreas formation in mice. In agreement with this, no pancreas abnormalities have been reported in patients with congenital heart disease associated with *GATA5* mutations.⁵⁶

GATA4 and GATA6 are, however, essential regulators of the expansion and maintenance of MPCs during early mouse pancreas development.^{53,57} Interestingly, and contrary to what it is observed in humans with *GATA6* mutations, GATA4 and GATA6 are functionally redundant in these early stages in mouse pancreas development. Conditional inactivation of either *Gata4* or *Gata6* in the pancreatic

progenitors using the pancreas-specific *Pdx1-Cre* line does not cause major pancreatic defects. However, simultaneous inactivation of both genes causes pancreatic agenesis or severe pancreatic hypoplasia. The pancreatic bud in *Gata4/Gata6* double mutant embryos is formed but fails to expand, exhibiting defects in epithelial branching as well as MPCs proliferation.^{53,57} Furthermore, the segregation of endocrine and acinar lineages is also severely affected. As discussed previously, the activation and maintenance of the pancreatic developmental program in MPCs are achieved by a complex regulatory program composed by a range of transcription factors. Many of these transcription factors directly regulate each other expression. Thus, GATA factors regulate *Pdx1* expression during early pancreas formation.^{53,57} Therefore, some of the pancreatic defects observed in *Gata4/Gata6* mutant embryos might be due to decreased *Pdx1* expression. Interestingly, although GATA factors are not needed for pancreas specification in the foregut endoderm, they are necessary to maintain pancreatic identity in MPCs. The absence of both GATA4 and GATA6 results in the conversion of the dorsal and ventral pancreas to intestinal and gastric cell fates, respectively.⁵⁸ This phenotype is caused, at least in part, from the aberrant activation of the *Shh* pathway in pancreatic progenitors (Figure 1). Thus, GATA4 and GATA6 contribute to maintaining pancreas identity through suppression of the *Shh* pathway. GATA4 and GATA6 seem to directly repress *Shh* expression in the pancreatic endoderm by binding the foregut endoderm enhancer MACS1.⁵⁸

GATA factors also act at later stages of pancreas formation. A recent study in *Gata6*-deficient mice has demonstrated an important role for GATA6 in β cell development and function. In this study, *Gata6* was inactivated during early pancreas development using the mouse *Pdx1-Cre* line.⁴¹ No pancreatic endocrine defects were observed in young *Gata6*-deficient mice. However, as they age (6 months old), they develop glucose intolerance, a phenotype indicative of defects in β cell function. Indeed, loss of GATA6 activity causes a vast array of abnormalities in adult β cells including impairment of insulin biosynthesis and secretion, defects in mitochondrial ultrastructure, and disorganization of the endoplasmic reticulum⁴¹ (Figure 2). These latter results are in agreement with an earlier study showing that GATA factors are required for endoplasmic reticulum integrity in mouse β cells.⁴² Studies performed in isolated human islets also point to an important role for GATA6 in the response to endoplasmic reticulum stress.⁵⁹ Loss of GATA6 has a broad impact on β cell gene expression.⁴¹ Transcriptome analysis of *Gata6*-deficient islets shows decreased expression of genes critical for different aspects of β cell function including glucose sensing (*Slc2a2*, encoding for GLUT2 transporter), insulin biosynthesis (*Ins1*, *Ins2*, and *Pcsk1*), and insulin secretion (*Abcc8*, *Cacna1c*, and SNAP-

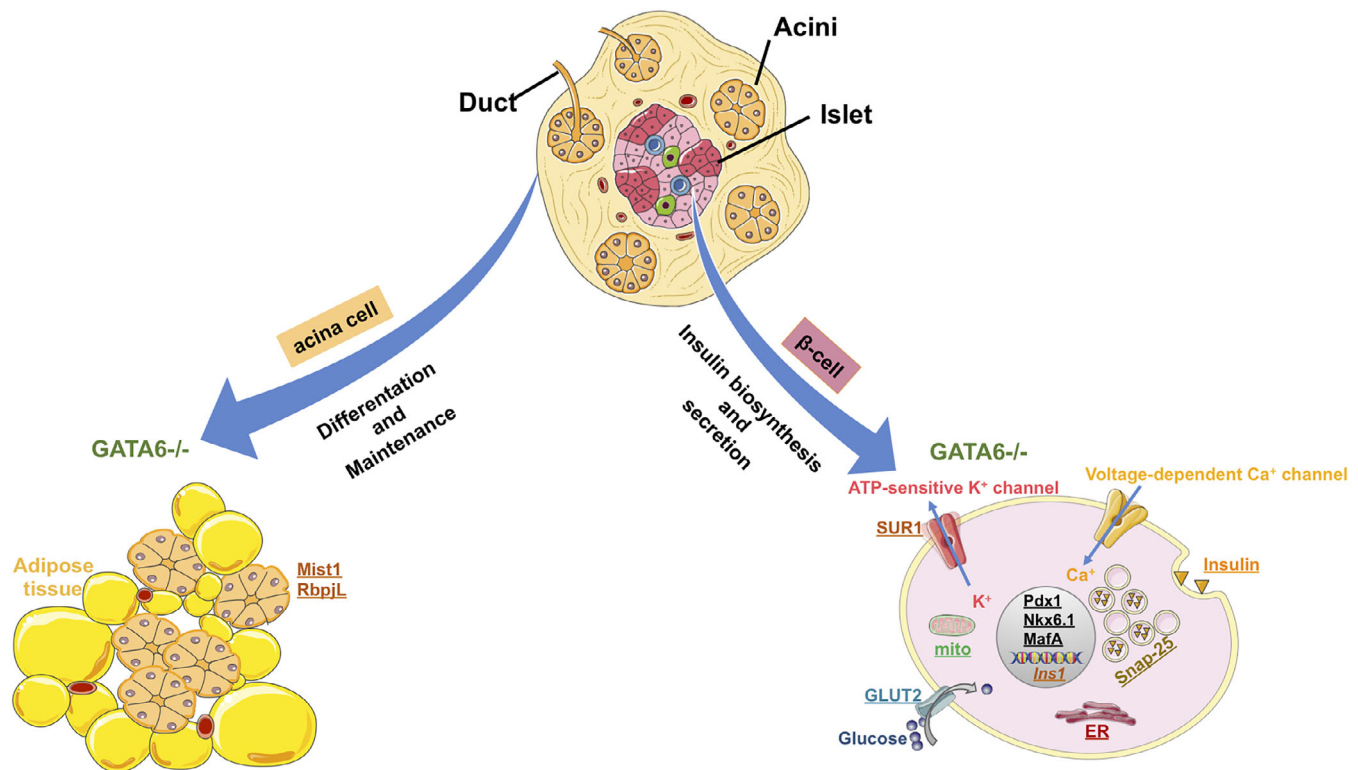


FIGURE 2 Function of GATA transcription factors in adult mouse pancreas. *Gata6* mutant pancreas exhibits acinar cell loss, acinar-to-ductal metaplasia, lipomatosis, and decreased expression of key transcription factors for acinar cell function (such as *Mist1* and *Rbpjl*). In β cells, loss of GATA6 activity results in decreased expression of genes' critical β cell function including key transcriptional regulators (*Pdx1*, *MafA*, and *Nkx6.1*), glucose sensing (*Slc2a2*, encoding for GLUT2 transporter), insulin biosynthesis (*Ins1* and *Ins2*), and insulin secretion (*Abcc8*, encoding for SUR1 and SNAP-25). Defects in mitochondrial (mito) ultrastructure and disorganization of the endoplasmic reticulum (ER) is also observed in *Gata6*-deficient β cells. This figure was created using Servier Medical Art templates, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://smart.servier.com>)

25). Importantly, the expression of key transcriptional regulators of adult β cell function such as *Pdx1*, *MafA*, and *Nkx6.1* was also diminished. Similar to what it is observed during pancreas embryonic development, GATA6 directly regulates the expression of *Pdx1* in adult β cells.⁴¹ Thus, the effects of GATA6 loss on adult β cell function might be indirect. While these studies demonstrate an essential role for GATA6 in mouse β -cell function, it remains to be determined whether the defects in glucose homeostasis in *Gata6*-deficient mice are caused by *Gata6* inactivation during embryonic stages or in adult β -cells. Further studies inactivating *Gata6* at different time points during pancreas formation as well as in adult stages will help to solve this issue. In this regard, the use of a Cre line to efficiently delete *Gata6* in adult β -cells would be highly valuable.

GATA6 also plays a role in acinar mouse cell differentiation.⁴⁰ As discussed earlier, mice deficient for *Gata6* are born and reach adulthood with no apparent pancreatic defects. However, genes important for acinar cell function including transcription factors and digestive enzymes are downregulated in *Gata6*-deficient pancreatic tissue. Importantly, GATA6 directly regulates the expression of key

genes that code for acinar transcription factors such as *Mist1* and *Rbpjl*.⁴⁰ These results indicate that GATA6 is necessary for full acinar differentiation. Furthermore, aged *Gata6* mutant mice display extensive loss of acinar cells, acinar-to-ductal metaplasia, fibrosis, and lipomatosis indicating that GATA6 is also required to maintain acinar cell identity in the adult pancreas (Figure 2). Interestingly, loss of GATA6 activity has also been linked to acinar cell dedifferentiation and tumorigenesis in a mouse model of *Kras*-driven pancreatic ductal adenocarcinoma (the most common type of pancreatic cancer) as well as in human pancreatic ductal adenocarcinoma.^{60–62} Indeed, GATA6 has been proposed to act as a tumor suppressor in the pancreas by maintaining acinar cell differentiation as well as regulating inflammatory and cancer-related pathways.⁶³

4 | HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS DIFFERENTIATION STUDIES ON GATA FACTORS

Although studies on the expression of GATA factors during human pancreas formation have been limited, the expression

patterns are similar to what it is observed in mouse development. *GATA4* is first observed in the pancreatic-specified gut endoderm at Carnegie Stage (CS) 12 of human embryonic development (around E9 of mouse development) and continues to be expressed in the pancreatic progenitor cells.¹ Around CS19 (E14.5–E15 in mouse), the expression becomes more localized to the tip domain and later is restricted to acinar cell lineage. *GATA6* expression has been reported in the early pancreatic progenitor domain (CS16–CS18)¹⁸ but information at other embryonic stages is scarce. Transcriptomic data indicate that *GATA6* is expressed in adult human pancreatic islet cells.^{59,64} The recent development of protocols for stepwise differentiation of hESCs and induced pluripotent stem cells (hPSCs) toward β -cells constitutes a relevant in vitro model for studying human pancreatic formation.^{65–68} The expression of *GATA4* and *GATA6* in hPSC differentiation cultures has been recently reported.^{69,70} Both *GATA4* and *GATA6* were found to be coexpressed at the definitive endoderm as well as early pancreatic progenitor stages, similar to what it is observed in mice. As pancreatic progenitor cells differentiate into β -like cells, *GATA4* and *GATA6* expression decrease (particularly *GATA6*) with no substantial expression in mature insulin-secreting cells.⁶⁹

The findings that *GATA4* and *GATA6* play redundant roles in mouse pancreas development seem slightly at odds with the human genetic studies showing that *GATA6* haploinsufficiency is associated with pancreatic agenesis. However, hPSCs differentiation studies have recently demonstrated that additional factors might be involved in the pancreatic defects associated with *GATA6* heterozygosity in humans. In these studies, the effects of *GATA6* on human pancreas differentiation were evaluated by inactivating *GATA6* via CRISPR/Cas9 technology or generating induced pluripotent stem cells from a patient with pancreatic agenesis carrying a mutation in *GATA6* and performing directed differentiation toward β cells in vitro. In contrast to what it is observed in patients with pancreatic agenesis, *GATA6* inactivation only has a moderate effect on the formation of pancreatic progenitor cells during in vitro differentiation. Furthermore, dosage-sensitive requirements for *GATA6* and *GATA4* in the formation of both definitive endoderm and pancreatic progenitor cells were demonstrated,⁶⁹ similar to the results described in double *Gata4/Gata6* mutant mice. A very interesting finding is that the reducing levels of RA during pancreatic differentiation in *GATA6* mutant hPSCs lines lead to more severe phenotypes. Remarkably, the reduction of RA also causes a decrease in *GATA4* expression that could potentially contribute to the pancreatic defects caused by *GATA6* inactivation. These findings might have important clinical implications, since they suggest that environmental signals may influence the pancreas phenotypes

caused by *GATA6* mutations. However, differences in individual genetic backgrounds among patients with *GATA6* mutations might also account for the variation in clinical presentation. The effect of RA on in vitro pancreatic cell formation in *GATA6* mutant lines also illustrates the importance of culture conditions in hPSCs differentiation studies. Slight variations exist in the current pancreatic β cell differentiation protocols that may potentially lead to different results.⁷¹ The use of standardized protocols and reagents would ensure that results can be properly compared among different studies.

The hPSCs in vitro differentiation approaches have also made it possible to directly assess the effect of *GATA6* inactivation on human β cell development. All the studies reported the generation of β cells from both homozygous and heterozygous *GATA6*-deficient cell lines albeit with decreased efficiency.^{69–71} Furthermore, hPSC-derived β cells carrying mutations in *GATA6* displayed decreased expression of genes important for β cell function including endocrine hormones and proteins involved in insulin secretion. One of the studies also reported defects in glucose-stimulated insulin secretion in *GATA6*-deficient β cells,⁷⁰ although it was not observed in other studies.⁶⁹ Collectively, these results suggest a potential role for *GATA6* in human β cell formation, a finding that could help to explain why certain patients with heterozygous *GATA6* mutations develop diabetes without exocrine insufficiency at adult stages.

5 | CONCLUSIONS

Studies performed over the last few years have uncovered a critical role for *GATA4* and *GATA6* in pancreas development and adult function. Mutations in both the transcription factors have been associated with the congenital anomalies of the pancreas in human. The use of genetically modified mouse models and hPSCs has demonstrated that *GATA4* and *GATA6* play multiple roles at different stages of pancreas formation as well as in adult pancreas. However, the specific cellular and molecular mechanisms through which *GATA* factors regulate these processes remain to be elucidated. Thus, *GATA*-regulated direct targets during pancreas development are largely unknown. Similarly, loss of *GATA6* activity has a profound impact on β cell gene expression, but whether a direct or indirect effect remains has to be established. Understanding the molecular link between *GATA6* and β cell function is of special interest as it might shed light on the mechanisms underlying diabetes onset in patients with *GATA6* mutations. These future studies may also help to uncover whether *GATA6* plays a more general role in β cell dysfunction in diabetes mellitus. To this regard, it would be interesting to analyze the function of *GATA6* in β cells under stress conditions associated with

diabetes such as obesity, hyperglycemia, and chronic low-grade inflammation. The analysis of GATA4 activity in β cells will also be necessary to determine whether GATA4 and GATA6 show some degrees of functional redundancy as they do during embryonic pancreas development. To this end, double inactivation of *Gata4* and *Gata6* at different time points and/or cell lineages during pancreas formation and postnatal life using specific mouse Cre lines would be very informative. The establishment of in vitro generated pancreatic β -like cells from hPSCs combined with the use of genomic editing tools constitutes a very powerful technology to analyze human pancreas development and function as demonstrated by the studies inactivating *GATA6* in hPSCs. Similar studies evaluating the inactivation of *GATA4* as well as the simultaneous inactivation of both *GATA4* and *GATA6* in hPSCs will clarify the precise roles of GATA factors in human pancreas development and adult function. Ideally, these approaches should be performed in three-dimensional in vitro organoids derived from hPSCs as they more closely resemble native organs.

ACKNOWLEDGMENTS

L.V. was supported by a contract from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (RYC-2013-14533). This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2017-82497-P and RYC-2013-14533 to A. R.). ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación cofunded with Fondos FEDER (PI16/00175 to D.A.C) and the Andalusian Ministry of Science and Innovation (CTS-7478 to D.A.C).

ORCID

Anabel Rojas  <https://orcid.org/0000-0003-0733-8277>

REFERENCES

- Jennings RE, Berry AA, Kirkwood-Wilson R, et al. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes*. 2013;62:3514–3522. <https://doi.org/10.2337/db12-1479>.
- Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Dev Dyn*. 2011;240:530–565.
- Gittes GK. Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Dev Biol*. 2009;326:4–35.
- Kumar M, Jordan N, Melton D, Grapin-Botton A. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol*. 2003;259:109–122.
- Hebrok M, Kim SK, Melton DA. Notochord repression of endodermal sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev*. 1998;12:1705–1713.
- Martin M, Gallego-Llamas J, Ribes V, et al. Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice. *Dev Biol*. 2005;284:399–411.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 1996;122:983–995.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 1994;371:606–609.
- Stoffers DA, Heller RS, Miller CP, Habener JF. Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology*. 1999;140:5374–5381.
- Beres TM, Masui T, Swift GH, Shi L, Henke RM, MacDonald RJ. PTF1 is an organ-specific and notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian suppressor of hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol Cell Biol*. 2006;26:117–130.
- Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CV, Magnuson MA. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol*. 2008;316:74–86.
- Azizoglu DB, Chong DC, Villaseñor A, et al. Vascular development in the vertebrate pancreas. *Dev Biol*. 2016;420:67–78.
- Munoz-Bravo JL, Hidalgo-Figueroa M, Pascual A, Lopez-Barneo J, Leal-Cerro A, Cano DA. GDNF is required for neural colonization of the pancreas. *Development*. 2013;140:3669–3679.
- Cano DA, Soria B, Martin F, Rojas A. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:2383–2402.
- Bastidas-Ponce A, Scheibner K, Lickert H, Bakhti M. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. *Development*. 2017;144:2873–2888.
- Shih HP, Wang A, Sander M. Pancreas organogenesis: From lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013;29:81–105.
- Larsen HL, Grapin-Botton A. The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;66:51–68.
- Cebola I, Rodriguez-Segui SA, Cho CH, et al. TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors. *Nat Cell Biol*. 2015;17:615–626.
- Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell*. 2007;13:103–114.
- Schaffer AE, Freude KK, Nelson SB, Sander M. Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev Cell*. 2010;18:1022–1029.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*. 2002;129:2447–2457.
- Masui T, Swift GH, Deering T, et al. Replacement of Rbpj with Rbpjl in the PTF1 complex controls the final maturation of pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2010;139:270–280.
- Holmstrom SR, Deering T, Swift GH, et al. LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function. *Genes Dev*. 2011;25:1674–1679.
- Lango Allen H, Flanagan SE, Shaw-Smith C, et al. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet*. 2011;44:20–22.
- Chao CS, McKnight KD, Cox KL, Chang AL, Kim SK, Feldman BJ. Novel GATA6 mutations in patients with pancreatic

- agenesis and congenital heart malformations. *PLoS One*. 2015;10:e0118449.
26. Catli G, Abaci A, Flanagan SE, et al. A novel GATA6 mutation leading to congenital heart defects and permanent neonatal diabetes: A case report. *Diabetes Metab*. 2013;39:370–374.
 27. Eifes S, Chudasama KK, Molnes J, et al. A novel GATA6 mutation in a child with congenital heart malformation and neonatal diabetes. *Clin Case Rep*. 2013;1:86–90.
 28. Gong M, Simaite D, Kuhn P, et al. Two novel GATA6 mutations cause childhood-onset diabetes mellitus, pancreas malformation and congenital heart disease. *Horm Res Paediatr*. 2013;79:250–256.
 29. Stanescu DE, Hughes N, Patel P, De Leon DD. A novel mutation in GATA6 causes pancreatic agenesis. *Pediatr Diabetes*. 2015;16:67–70.
 30. Suzuki S, Nakao A, Sarhat AR, et al. A case of pancreatic agenesis and congenital heart defects with a novel GATA6 nonsense mutation: Evidence of haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *Am J Med Genet A*. 2014;164A:476–479.
 31. De Franco E, Shaw-Smith C, Flanagan SE, et al. GATA6 mutations cause a broad phenotypic spectrum of diabetes from pancreatic agenesis to adult-onset diabetes without exocrine insufficiency. *Diabetes*. 2013;62:993–997.
 32. Yorifuji T, Kawakita R, Hosokawa Y, Fujimaru R, Yamaguchi E, Tamagawa N. Dominantly inherited diabetes mellitus caused by GATA6 haploinsufficiency: Variable intrafamilial presentation. *J Med Genet*. 2012;49:642–643.
 33. Yau D, De Franco E, Flanagan SE, Ellard S, Blumenkrantz M, Mitchell JJ. Case report: Maternal mosaicism resulting in inheritance of a novel GATA6 mutation causing pancreatic agenesis and neonatal diabetes mellitus. *Diagn Pathol*. 2017;12(1):2–7.
 34. Bonnefond A, Sand O, Guerin B, et al. GATA6 inactivating mutations are associated with heart defects and, inconsistently, with pancreatic agenesis and diabetes. *Diabetologia*. 2012;55:2845–2847.
 35. Shaw-Smith C, De Franco E, Lango Allen H, et al. GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes. *Diabetes*. 2014;63:2888–2894.
 36. Decker K, Goldman DC, Grash CL, Sussel L. Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Dev Biol*. 2006;298:415–429.
 37. Nemer G, Nemer M. Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev Biol*. 2003;254:131–148.
 38. Ritz-Laser B, Mamin A, Brun T, Avril I, Schwitzgebel VM, Philippe J. The zinc finger-containing transcription factor Gata-4 is expressed in the developing endocrine pancreas and activates glucagon gene expression. *Mol Endocrinol*. 2005;19:759–770.
 39. Ketola I, Otonkoski T, Pulkkinen MA, et al. Transcription factor GATA-6 is expressed in the endocrine and GATA-4 in the exocrine pancreas. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;226:51–57.
 40. Martinelli P, Canamero M, del Pozo N, Madriles F, Zapata A, Real FX. Gata6 is required for complete acinar differentiation and maintenance of the exocrine pancreas in adult mice. *Gut*. 2013;62:1481–1488.
 41. Villamayor L, Rodriguez-Seguel E, Araujo R, et al. GATA6 controls insulin biosynthesis and secretion in adult beta-cells. *Diabetes*. 2018;67:448–460.
 42. Sartori DJ, Wilbur CJ, Long SY, et al. GATA factors promote ER integrity and beta-cell survival and contribute to type 1 diabetes risk. *Mol Endocrinol*. 2014;28:28–39.
 43. Rojas A, Schachterle W, Xu SM, Black BL. An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse Gata4 gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo. *Dev Dyn*. 2009;238:2588–2598.
 44. Freyer L, Schroter C, Saiz N, et al. A loss-of-function and H2B-Venus transcriptional reporter allele for Gata6 in mice. *BMC Dev Biol*. 2015;15:38.
 45. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. 1997;11:1048–1060.
 46. Molken JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. 1997;11:1061–1072.
 47. Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosfeld F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*. 1999;126:723–732.
 48. Watt AJ, Zhao R, Li J, Duncan SA. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Dev Biol*. 2007;7:37.
 49. Bossard P, Zaret KS. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development*. 1998;125:4909–4917.
 50. Zaret KS, Watts J, Xu J, Wandzioch E, Smale ST, Sekiya T. Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: Programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;73:119–126.
 51. Thompson CA, Wojta K, Pulakanti K, Rao S, Dawson P, Battle MA. GATA4 is sufficient to establish Jejunal versus Ileal identity in the small intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3:422–446.
 52. Beuling E, Bosse T, van de Kerk DJ, et al. GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors. *Dev Biol*. 2008;322:179–189.
 53. Xuan S, Borok MJ, Decker KJ, et al. Pancreas-specific deletion of mouse Gata4 and Gata6 causes pancreatic agenesis. *J Clin Invest*. 2012;122:3516–3528.
 54. Weber H, Symes CE, Walmsley ME, Rodaway AR, Patient RK. A role for GATA5 in *Xenopus* endoderm specification. *Development*. 2000;127:4345–4360.
 55. Reiter JF, Kikuchi Y, Stainier DY. Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation. *Development*. 2001;128:125–135.
 56. Jiang JQ, Li RG, Wang J, et al. Prevalence and spectrum of GATA5 mutations associated with congenital heart disease. *Int J Cardiol*. 2013;165:570–573.
 57. Carrasco M, Delgado I, Soria B, Martin F, Rojas A. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest*. 2012;122:3504–3515.
 58. Xuan S, Sussel L. GATA4 and GATA6 regulate pancreatic endoderm identity through inhibition of hedgehog signaling. *Development*. 2016;143:780–786.
 59. Cnop M, Abdulkarim B, Bottu G, et al. RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes*. 2014;63:1978–1993.
 60. Martinelli P, Madriles F, Canamero M, et al. The acinar regulator Gata6 suppresses KrasG12V-driven pancreatic tumorigenesis in mice. *Gut*. 2016;65:476–486.



61. Hermann PC, Sancho P, Canamero M, et al. Nicotine promotes initiation and progression of KRAS-induced pancreatic cancer via Gata6-dependent dedifferentiation of acinar cells in mice. *Gastroenterology*. 2014;147:1119–1133. e1114.
62. Martinelli P, Carrillo-de Santa Pau E, Cox T, et al. GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Gut*. 2017;66:1665–1676.
63. Bailey P, Chang DK, Nones K, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016;531:47–52.
64. Teo AKK, Lim CS, Cheow LF, et al. Single-cell analyses of human islet cells reveal de-differentiation signatures. *Cell Death Discov*. 2018;4:14.
65. Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, et al. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell*. 2014;159:428–439.
66. Russ HA, Parent AV, Ringler JJ, et al. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *EMBO J*. 2015;34:1759–1772.
67. Rezanian A, Bruin JE, Arora P, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32:1121–1133.
68. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2006;24:1392–1401.
69. Shi ZD, Lee K, Yang D, et al. Genome editing in hPSCs reveals GATA6 haploinsufficiency and a genetic interaction with GATA4 in human pancreatic development. *Cell Stem Cell*. 2017;20:675–688. e676.
70. Tiyyaboonchai A, Cardenas-Diaz FL, Ying L, et al. GATA6 plays an important role in the induction of human definitive endoderm, development of the pancreas, and functionality of pancreatic beta cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8:589–604.
71. Chia CY, Madrigal P, Denil S, et al. GATA6 cooperates with EOMES/SMAD2/3 to deploy the gene regulatory network governing human definitive endoderm and pancreas formation. *Stem Cell Reports*. 2019;12:57–70.

How to cite this article: Villamayor L, Cano DA, Rojas A. GATA factors in pancreas development and disease. *IUBMB Life*. 2019;1–9. <https://doi.org/10.1002/iub.2170>